

Universitat de Lleida



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agrària

EFFECTIVITAT DE L'OZÓ SOBRE ELS CULTIUS MARINS EN RECIRCULACIÓ

PROJECTE FINAL DE CARRERA

Isolda Banús Vilaprinnyó
Tutor: Frederic Casals
Co-tutor: Ricard Carbó

Lleida, juny de 2010

Aquest treball ha estat realitzat en l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) de Sant Carles de l'Arbúcies i ha estat finançat pel projecte de JACUMAR (Junta Asesora de Cultivos Marinos, pertanyent al MARM, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino) "Tecnología de la recirculación y desinfección en acuicultura marina" durant els anys 2005-2008.

El meu més sincer agraïment a totes les persones que han col·laborat d'alguna manera en la realització del present treball.

Al Frederic Casals i Ricard Carbó pel seu tutoratge i ajut.

A l'Ana Roque, l'Alicia Estévez i els companys de l'IRTA pel suport que m'han donat, i la grandíssima paciència que han tingut.

Als amics que m'han ajudat en tot moment.

I a la meva família pel seu suport, grans i petits de casa.

ÍNDEX DE CONTINGUTS

1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Estat de l'aqüicultura mundial, europea i espanyola	1
1.2. Activitats d'investigació científica	2
1.3. Sistemes de recirculació en aqüicultura (SRA)	3
1.3.1. Paràmetres de qualitat de l'aigua	4
1.3.2. Tractaments	8
1.4. L'ozó en sistemes de recirculació	9
1.4.1. Residus generats per l'ozó	11
1.4.2. Aplicacions de l'ozó	12
1.4.3. Subministrament de l'ozó	15
1.4.4. Ozó ambiental	16
1.5. Generador d'ozó	17
1.5.1. Descàrrega de barrera dielèctrica (DBD)	17
1.6. Metodologia per a mesurar l'ozó	18
2. OBJECTIUS.....	21
3. MATERIAL I MÈTODES COMUNS	22
3.1 Localització i descripció de les instal·lacions	22
3.2. Equips i material utilitzat	24
3.3. Anàlisi estadística	27
4. CAPÍTOL I: EXPERIMENTACIÓ AMB PEIXOS	28
4.1. Experiment 1/Orada	28
4.1.1. Material i mètodes	28
4.1.2. Resultats i discussió	29
4.2. Experiment 2/Alevins de reig	35
4.2.1. Material i mètodes	35
4.2.2. Resultats i discussió	36
4.3. Experiment 3/Juvenils d'orada.....	42
4.3.1. Material i mètodes	42
4.3.2. Resultats i discussió	43
4.4. Discussió general	50
5. CAPÍTOL II: Experimentació amb rotífer.....	52
5.1. Experiment 4/Cultiu de rotífer	54
5.1.1. Material i mètodes	54

5.1.2. Resultats i discussió	56
5.2. EXPERIMENT 5/DESINFECCIÓ DE ROTÍFER.....	65
5.2.1. Material i mètodes	65
5.2.2. Resultats i discussió	67
5.3. Experiment 6/Cultiu i desinfecció de rotífer	69
5.3.1. Material i mètodes	69
5.3.2. Resultats i discussió	71
5.4. Experiment 7/Cultiu i desinfecció de rotífer	74
5.4.1. Material i mètodes	74
5.4.2. Resultats i discussió	75
5.5. Discussió general	78
6. CAPÍTOL III: EXPERIMENTACIÓ AMB EL BIOFILTRE.....	79
6.1. Experiment 8/Biofiltre	79
6.1.1. Material i mètodes	79
6.1.2. Resultats i discussió	80
6.2. Discussió general	83
7. CONCLUSIONS	84
8. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES	86

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Estat de l'aqüicultura mundial, europea i espanyola

L'aqüicultura segons la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) es defineix com "el cultiu d'organismes aquàtics, incloent peixos, mol·luscs, crustacis i plantes aquàtiques que implica la intervenció de l'home en el procés de cria per a augmentar la producció en operacions com la sembra, l'alimentació i la protecció dels depredadors. L'activitat de cultiu també pressuposa que els individus o associacions que l'exerceixen són propietaris de la població sota cultiu. La producció aqüícola és el producte de les activitats aqüícoles, l'objectiu final del qual és el consum" (FAO, 1997).

La investigació en aqüicultura va començar fa menys de 100 anys, encara que fa segles el cultiu de peix tradicional ha format part de la vida rural de l'home. La forma més primitiva que es coneix és el manteniment i el cultiu de carpes (*Cyprinus carpio*) en estanys naturals d'aigua dolça a Xina (Ling, 1977). També es tenen indicis que en l'any 2500 a.C. es cultivava tilàpia (*Oreochromis* sp).

Al llarg d'aquests segles, l'aqüicultura s'ha anat expandint i desenvolupant degut al ràpid increment de la població mundial, a l'increment general de la demanda de productes marins, de l'establiment de lleis marítimes, i a l'estabilització de pesca extractiva, entre altres. Tan és així, que en els quatre últims decennis el consum mundial de peix per càpita ha passat de 9 kg l'any 1961 a 16,5 kg l'any 2003 (FAO, 2005); exceptuant els països de baixos ingressos i gran dèficit d'aliments. Es preveu que la demanda de peix seguirà augmentant en els pròxims decennis.

Des de finals dels anys 80, la producció de peixos mitjançant l'extracció pesquera ha arribat al límit d'explotació dels recursos pesquers marins mundials i, en el millor dels casos, es tendirà a mantenir un nivell de producció estable (FAO, 2005). Com a conseqüència, el sector de l'aqüicultura (l'activitat industrial realment productiva) s'ha desenvolupat en gran mesura els últims 20 anys, presentant un continu creixement en la contribució al subministrament mundial de productes, passant de proveir un 3,9% de la producció total en pes l'any 1970 al 27,1% l'any 2000, i a un 32,4% l'any 2004, l'equivalent a un augment de la producció en 40 milions de tones l'any 2007 (FAO, 2006).

Espanya, en tenir gairebé 8000 km de costa amb una orografia i un clima molt divers, proporciona les característiques físico-químiques i ambientals necessàries per al desenvolupament de l'aqüicultura marina. A més a més, conta amb nombrosos recursos fluvials, llacs i

embassaments, on es donen les condicions idònies per al desenvolupament de l'aqüicultura continental. En general, la majoria de les Comunitats es limiten al cultiu de poques espècies; en cas contrari, Andalusia, Galícia i Catalunya han diversificat la seva producció en gran mesura. S'ha de tenir en compte que, com a país amb tradició pesquera té uns importants hàbits de consum de peix, 38 kg per habitant i any (FAO, 2006) aproximadament, triplicant gairebé la mitjana europea.

La producció aqüícola a nivell espanyol es va situar l'any 2003 en més de 313.286 tones, de les que 280 mil tones aproximadament corresponien al cultiu d'espècies marines (89,3% del total de la producció) i la resta a l'aqüicultura continental (33.391 tones; 10,4 % de la producció total). La figura 1 mostra la producció aqüícola total a Espanya a partir de l'any 1950:

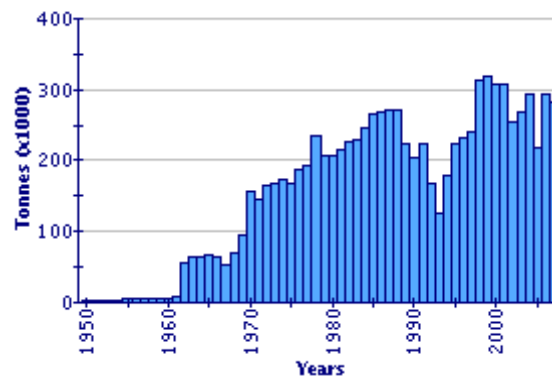


Figura 1: Producció aqüícola espanyola. Font: FAO, 2007

En quant a l'aqüicultura marina, la producció de peixos ha experimentat un creixement important durant els últims anys, sobre tot en orada (*Sparus aurata*) i llobarro (*Dicentrarchus labrax*). Altres espècies marines de peix que actualment s'estan criant a escala comercial són: turbot (*Psetta maxima*), besuc de fonera (*Pagellus bogaraveo*), reig (*Argyrosomus regius*) i llenguado (*Solea solea*). Els organismes aquàtics que es troben en fase d'investigació avançada són el pargo (*Pagrus pagrus*), el mollet (*Mullus* sp) i el pop (*Octopus vulgaris*) (FAO, 2006).

1.2. Activitats d'investigació científica

A Espanya, el finançament de les activitats de desenvolupament i d'investigació científica està a càrrec d'entitats estatals, autonòmiques, comunitàries i empresarials. Una d'aquestes entitats financeres, com és la Secretaria General de Pesca Marítima (SGPM), junt amb la Junta Nacional Assessora de Cultius Marins (JACUMAR), són les encarregades

de finançar els projectes d'investigació que, dins del marc del Pla de Cultius Marins, proposen les Comunitats Autònomes per a realitzar els projectes en centres d'investigació o universitats del seu entorn jurisdiccional. El finançament prové del fons de la SGPM i és transferida a les Comunitats Autònomes (MARM, 2009). JACUMAR pretén fomentar d'aquesta manera, el desenvolupament tecnològic necessari per a incrementar la competitivitat industrial, tant a nivell nacional com internacional, i la investigació científica.

L'any 2005 es va proposar el projecte "Tecnologia de la recirculació i desinfecció en Aqüicultura marina" a quatre Comunitats Autònomes: Andalusia, Catalunya, Galícia i Múrcia. En el cas de Catalunya, el subprojecte a dur a terme era "Recirculació i Ozonització en el CA-IRTA". Es plantejava treballar en recirculació utilitzant ozó per a la desinfecció de l'aigua en les instal·lacions de l'IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària) de Sant Carles de la Ràpita, en els mòduls autònoms de tractaments d'aigua v.1.2. En aquest treball s'explicarà el desenvolupament i seguiment del projecte de "Recirculació i Ozonització" que s'ha realitzat.

1.3. Sistemes de recirculació en aqüicultura (SRA)

La incorporació de sistemes de recirculació d'aigua total o parcial en l'aqüicultura marina va essent més necessària per a que l'aqüicultura sigui més productiva i més sostenible a fi de reduir costos, impacte ambiental i/o millorar les tècniques de producció quan les condicions de situació de les granges no s'ajusten als requeriments ambientals de les espècies cultivades (Zohar et al., 2005). Com a conseqüència, el cost de producció es veu molt afectat. Per aquesta raó, cada vegada més empreses i centres d'investigació opten per a aquests tipus de sistemes. Les restriccions normatives i mediambientals són també un factor a tenir en compte, ja que d'alguna manera obliguen a utilitzar tecnologies respectuoses amb el medi ambient. A més a més, l'ús del SRA disminueix l'impacte ambiental per minimització de residus provinents del cultiu i té en compte la conservació d'aigües.

Un sistema de recirculació d'aigua és un sistema tancat, que ha de garantir una qualitat constant i controlada (amb poques i petites variacions) dels paràmetres físico-químics de l'aigua al llarg del temps aportant una renovació d'aigua diària no superior al 10% (Timmons et al., 1991; Zohar et al., 2005). Aquests sistemes permeten la independència de les variacions mediambientals i un control de les condicions necessari pel desenvolupament d'experiments en el que moltes variables han de ser estables, per a no emmascarar els valors de les variables que s'estan estudiant. Els factors més importants a controlar són els compostos nitrogenats, l'oxigen dissolt i el pH de l'aigua.

La recirculació té els següents avantatges (Losordo et al., 1998; Suantika et al., 2003):

- disminueix el requeriment d'aigua
- permet una producció continua tot l'any
- augmenta la productivitat (kg/m³ d'aigua consumida)
- augmenta la conversió de l'aliment
- el control sobre el sistema és millor

I els inconvenients següents, entre d'altres (Losordo et al., 1998; Suantika et al., 2003):

- alta inversió inicial
- el sistema és més complex i es necessita de personal qualificat per al seu control
- poden existir problemes de toxicitat derivats de l'amoni, del CO₂ o dels bromurs dissolts
- poden existir problemes de deficiència en la filtració

Un sistema de tractament d'aigua en circuit tancat requereix una sèrie de material: uns dipòsits d'aigua per a l'espècie de cultiu, una unitat de tractament d'aigua i una bomba. El més important és la unitat de tractament d'aigua, que consta de diferents parts amb funcionalitats diferents (Losordo et al., 1998):

EQUIPAMENT	FUNCIO
Filtre mecànic	Eliminar els residus mitjançant separació física
Filtre biològic	Oxidar els amonis i nitrits, tòxics pels peixos
Desgasificador	Eliminar la sobresaturació de N ₂ o CO ₂
Oxigenació	Airejar i oxigenar l'aigua
Intercanviador de calor	Calentar o refredar l'aigua abans que l'aigua arribi al sistema de cultiu i als peixos
UV o ozó	Desinfectar l'aigua a fi d'evitar l'entrada (i residència) de possibles patògens

Les instal·lacions de SRA existents són molt variades en quant al disseny, el dimensionament, la seva aplicació i l'espècie cultivada, tot i tenir un mateix objectiu (Losordo et al., 1998).

1.3.1. Paràmetres de qualitat de l'aigua

L'aigua d'abastiment varia segons la geologia i les característiques edafològiques del terreny. En recirculació, és important conèixer els paràmetres físico-químics de l'aigua, ja que estan tots interrelacionats. Per aquesta raó, és convenient saber com intervenen. Tot seguit, s'expliquen els més importants.

Oxigen

L'aport d'oxigen està destinat a mantenir les necessitats metabòliques dels organismes de cultiu però també dels bacteris nitrificants. Aquests necessiten que l'oxigen es mantingui en un nivell òptim de saturació. S'ha de tenir en compte que el consum per part dels bacteris del filtre biològic és força elevat:

- 1 mg de $\text{NH}_4\text{-N}$ oxidat a $\text{NO}_2\text{-N}$, provoca un consum de 3-3,4 mg d' O_2 per part dels bacteris
- 1 mg de $\text{NO}_2\text{-N}$ oxidat a $\text{NO}_3\text{-N}$, provoca un consum de 4-4,6 mg d' O_2 per part dels bacteris

És a dir, que el consum d'oxigen exclusivament del biofiltre serà d'uns 7-8 mg/l d'oxigen (Wheaton, 1977; Timmons i Losordo, 2002; Tucker, 1998).

Temperatura

Aquesta variable física influeix de manera directa sobre els processos fisiològics (respiració, alimentació, índex de conversió de l'aliment, creixement, reproducció i comportament), tenint cada espècie el seu rang òptim de temperatures.

Treballant en circuit tancat es pot variar la temperatura de l'aigua del circuit respecte la de l'aigua ambiental, de manera que es pot treballar a la temperatura desitjada en qualsevol època de l'any, de manera més econòmica que en circuit obert. D'aquesta manera, s'ha de vigilar que sigui estable, per a no alterar física i fisiològicament l'animal.

L'oxigen dissolt, entre d'altres, és un paràmetre que depèn directament de la temperatura degut a la seva solubilitat en l'aigua; a més temperatura, menys oxigen es dissol.

pH

Aquest valor expressa la concentració de ions hidronis presents en l'aigua i s'equilibra per mitjà d'un sistema carbonat-bicarbonat (Figura 2). Aquest sistema explica el procés del pH en l'aigua salada en funció de les concentracions de carbonats, bicarbonats i CO_2 (l).

Els ions hidronis tendeixen a combinar-se amb l'ió bicarbonat, donant lloc a àcid carbònic, que ràpidament es dissocia en CO_2 i aigua. D'altra banda, un augment del pH vol dir més proporció de ions carbonat en el sistema en forma de carbonat càlcic (Wurts i Durborow, 1992).

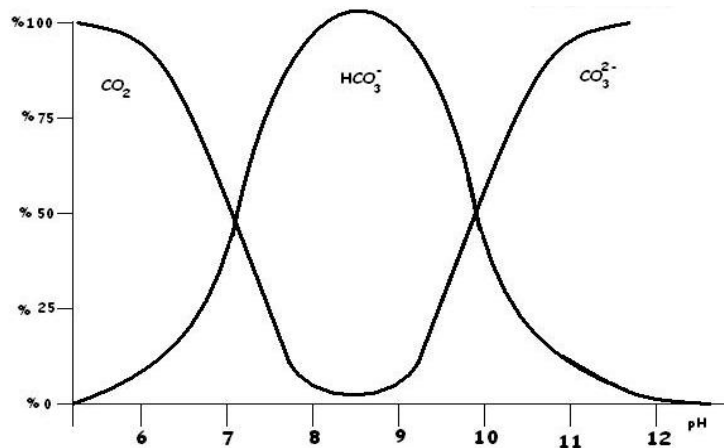


Figura 2: El sistema carbonat-bicarbonat en l'aigua salada. Font: www.todomarino.com

Treballant en recirculació s'han de controlar les entrades d'agents orgànics, ja que hi ha una sèrie de reaccions de sals en equilibri en l'aigua. Per tant, es pot dir que el pH influeix directament sobre l'alcalinitat de l'aigua i el nivell d'amoni dissolt; generalment, el pH en circuit tancat té tendència a baixar. S'ha de tenir en compte que pH àcids redueixen l'activitat dels bacteris nitrificants i, d'altra banda, la proporció d'amoniac (l'amoni més tòxic) és menor.

Alcalinitat

És una mesura que fa referència a la capacitat de neutralitzar l'àcid de l'aigua (pH), en la que hi contribueixen el CO_2 i els ions carbonat i bicarbonat (CO_3^{2-} i HCO_3^-), entre d'altres (Wurst i Durborow, 1992). Aquests ions es mantenen en equilibri, amb proporcions diferents segons el pH de l'aigua (Figura 3).

CO_2 (g)

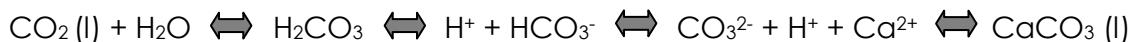


Figura 3: Formes de carboni en l'aigua salada. Font: www.ugr.es

Compostos nitrogenats

En sistemes de recirculació aquests productes acostumen a ser problemàtics, degut a que determinades concentracions, depenent del compost i de l'espècie, poden tenir efectes subletals o letals. En la taula 1 es mostren els valors recomanats per Tucker (1998) per a peixos d'aigua de mar. Es tracta de valors molt generals i seria necessari adequar-los a les espècies de peixos mediterrànies.

Taula 1: Valors considerats segurs en peixos d'aigua de mar (Tucker, 1998).

	Aquaris	Aqüicultura producció	Larves	Adults
pH			8-8,4	7-8,5
N-NH ₄ ⁺ (mg/l)*	10,2	<10,20	<1,0	<5,0
N-NH ₃ (mg/l)	1,0	<1,0	<0,1	<0,5
N-NH ₄ ⁺ +NH ₃	11,2	<11,20	<1,1	<5,5
N-NO ₂ (mg/l)		10,0	0,1	1,0
N-NO ₃ (mg/l)	50		20,0	50,0

* NH₄⁺ s'ha estimat a partir de la salinitat, temperatura i pH (35 ppt, 28°C, pH 8,3).

Els compostos nitrogenats procedeixen del metabolisme de les proteïnes contingudes en l'aliment. Un cop l'aliment és ingerit, els organismes aquàtics excreten el nitrogen en forma d'aminoàcids, amines volàtils i urea, però principalment en forma d'amoni (NH₄⁺) (Tucker, 1998). L'amoni és oxidat a nitrit per bacteris del gènere *Nitrosomonas* i *Nitrosococcus*, i el nitrit és oxidat a nitrat per *Nitrobacter*, *Nitrococcus* i *Nitrospina* amb l'ajuda d'un biofiltre (Figura 4).

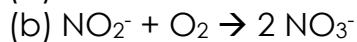
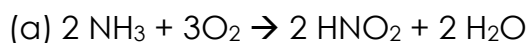
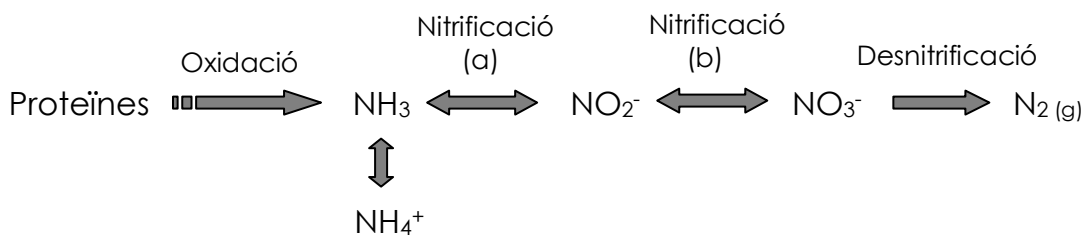


Figura 4: Esquema evolutiu dels compostos nitrogenats

Tots ells són altament solubles en l'aigua de cultiu. L'amoníac es presenta en dos formes: ionitzat i no ionitzat, aquest últim és altament tòxic. L'amoníac total (TAN) és la suma dels dos productes i la seva presència depèn del pH, la salinitat i la temperatura del medi; com més alt és el pH i més elevada és la temperatura, més elevada és la concentració en NH₃ (Losordo et al., 1998).

Els nitrits procedeixen de la oxidació de l'amoni o amoníac. Els bacteris nitrificants (*Nitrosomonas*) utilitzen el nitrogen com a font d'energia per a créixer i produir nitrits. El nitrit no és tan tòxic però s'ha de controlar. Els bacteris *Nitrobacter*, utilitzen els nitrits com a font d'energia per a produir nitrats. Aquests no suposen un problema ja que els peixos els toleren a

alts nivells. En recirculació, es controlen per mitjà de l'intercanvi diari de l'aigua nova que entra al sistema, mantenint els nivells dins d'uns valors assumibles pel cultiu (Tango i Gagnon, 2003).

És possible que en circuit tancat els compostos nitrogenats estiguin en concentracions que són considerades estressants pel peix o que interfereixin en el seu creixement, ja que una pujada progressiva dels nivells dels compostos nitrogenats vol dir una adaptació per part del peix (Losordo, 1998; Timmons et al., 2002).

Sòlids sedimentables, en suspensió i dissolts en l'aigua

El rebuig orgànic de qualsevol sistema en aqüicultura és: l'aliment no ingerit, les partícules fines de l'aliment, les femtes, les algues o les pel·lícules bacterianes despreses del biofiltre. Tots poden afectar sèriament sobre la salut dels peixos actuant sobre el seu sistema branquial i augmentant el risc de patògens, ja que incorporen nutrients a l'aigua.

1.3.2. Tractaments

Tractaments dels sòlids

Els sòlids sedimentables s'eliminen bé pel desguàs del tanc de cultiu, sifonat o bé mantenint-se en suspensió i eliminant-los mitjançant filtres, per filtració mecànica. Els sòlids dissolts en l'aigua i els col·loïdes, s'eliminen mitjançant fraccionadors d'escuma (*protein-skimmer*) de manera que es desplacen amb l'escuma que flota (Phillip et al., 2004). D'altra banda, també es poden retirar del sistema utilitzant ozó, gràcies a les seves característiques (Timmons et al., 1991; Timmons and Losordo, 1994).

En la figura següent (Figura 5) es mostren les diferents mides dels sòlids en l'aigua (Timmons et al., 2002).

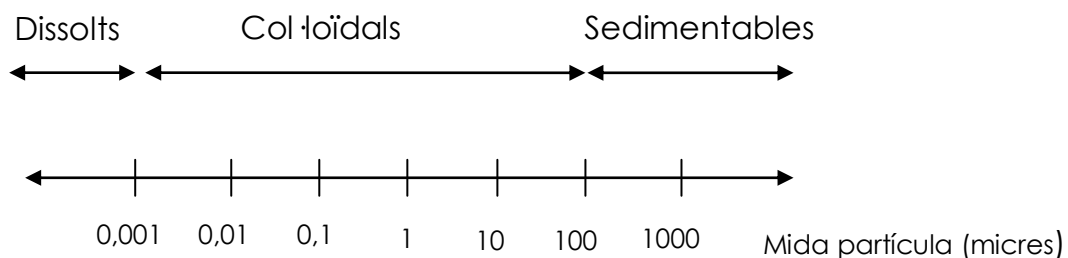


Figura 5: Caracterització de mida dels sòlids en l'aigua (Losordo et al., 1998).

Tractament dels compostos nitrogenats

Els compostos nitrogenats són eliminats en gran part pels biofiltres. Aquests, com s'ha explicat anteriorment, estan formats per bacteris que creixen de forma activa sobre una superfície, com ara grava, sorra, boles de plàstic o anelles de plàstic, i són actius durant un període llarg de temps. Únicament fallen si en el medi hi ha algun tipus de toxicitat pel bacteris, com falta d'oxigen, baix pH, o bé per envelliment (Timmons and Losordo, 1994).

1.4. L'ozó en sistemes de recirculació

L'ozó és una forma al·lotròpica de l'oxigen amb fórmula O_3 (Juan, 2004). La geometria és de tipus angular i la seva estructura molecular ve representada per diverses maneres ressonants (Figura 6), essent la 1 i la 2 les predominants.

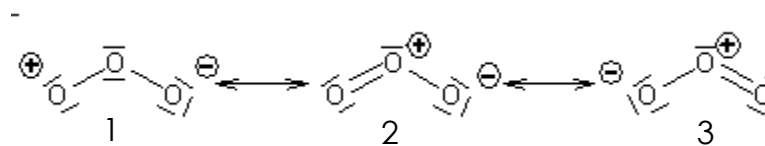


Figura 6: Ressonàncies de l'estructura molecular de l'ozó (Fernández-Crehuet et al., 2001).

L'ozó és un gas de color blau pàl·lid, irritant, explosiu i tòxic per a persones fins i tot a molt baixes concentracions, 5 ppm (Summerfelt et al., 2009). És molt fàcilment detectable en l'aire, el valor límit d'olor és d'uns 0,01 ppm, o bé 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ d'ozó (Aguayo et al., 2005), degut a la seva olor penetrant tan característica, com ara l'olor de l'aire de tempesta o l'aire que rodeja els aparells elèctrics (per això el seu nom, que en greg *Ozein* significa olor) (Juan, 2004).

La formació de l'ozó és una reacció exotèrmica (ProMinent, OZVa Type 1 and 2, 2004):

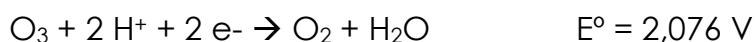


Es forma quan la molècula d'oxigen (O_2) és forçada a incorporar un tercer àtom creant una molècula triatòmica (O_3). Aquest tercer àtom s'uneix d'una manera molt lleugera pel qual l'ozó és molt inestable, el que fa que l'ozó sigui un agent oxidant ideal per al tractament de l'aigua. La ressonància d'aquesta molècula no permet la possibilitat d'electrons no aparellats, per tant, a diferència de l'oxigen, és una substància no paramagnètica (Juan, 2004).

La principal conseqüència de la inestabilitat de l'ozó és que no pot ser emmagatzemat ni transportat en un període llarg de temps, pel que la seva producció haurà d'efectuar-se en el moment i el lloc d'utilització (Timmons et al., 2002; Juan, 2004).

L'O₃ és soluble en moltes substàncies formant solucions estables o metaestables. En l'aigua, l'ozó és 14 vegades més soluble que l'oxigen, però forma una solució metaestable que depèn principalment de la pressió, temperatura però també de les impureses presents en l'aigua (Juan, 2004).

Si bé l'oxigen es combina amb tots els elements, ho fa a temperatures altes, mentre que l'ozó reacciona amb nombroses substàncies en condicions en que l'oxigen és inactiu (Juan, 2004). El potencial d'oxidació de l'ozó a pH=0 és:



Essent superior al del peròxid d'hidrogen (1,77 V) o al del clor (1,36 V). En medi àcid, el poder oxidant únicament és superat pel fluor, l'oxigen atòmic, el radical OH· i poques altres substàncies (Juan, 2004). Entenem com a potencial redox la mesura de l'activitat d'electrons; com més elevat és el potencial, més caràcter oxidant té la substància i, per tant, més tendència a reduir-se fàcilment. Es pot dir doncs, que l'ozó és una substància molt oxidant pel medi marí.

Altres propietats físiques de l'ozó es mostren a la taula 2:

Taula 2: Propietats físiques generals de l'ozó (Pla JACUMAR, 2005; Aguayo et al., 2005).

Característiques	Valor
Massa molecular	47,998 g/mol
Densitat gas (0°C, 101 kPa)	2,144 kg/m ³
Densitat líquid (-112°C)	1,572 kg/m ³
Densitat relativa (aire)	1,568
Punt de fusió	-197,7°C
Punt d'ebullició	-111,9°C
Solubilitat en aigua (0°C)	1,05 g/l
Solubilitat en aigua (20°C)	0,57 g/l
Potencial oxidatiu (pH àcid)	2,07 V
Potencial oxidatiu (pH bàsic)	1,24 V

S'han vist que l'ozó aporta moltes avantatges en l'aqüicultura (en SRA), però no està àmpliament utilitzat, primerament pel seu cost d'instal·lació, però també per la seva toxicitat en els animals aquàtics quan s'injecta una dosi elevada (Summerfelt, 2003; Suantika et al., 2003). La falta d'equips i tests químics fiables n'és una altra causa (Bullock et al., 1997).

1.4.1. Residus generats per l'ozó

Existeixen moltes diferències en l'ozonització de l'aigua dolça i l'aigua salada. Particularment, la presència de ions bromit en aigua salada i la seva reactivitat amb l'ozó. En aigua dolça, l'ozó actua directament com a oxidant, mentre que, l'ozonització en aigua salada implica una sèrie de reaccions redox i varis reactius òxids de brom intermitjos, que suposa un greu risc per a la salut dels peixos i el marisc (Summerfelt, 2003; Tango i Gagnon, 2003).

Els productes associats a la ozonització són presents en baixes concentracions, fins a màxim 0,05 mg/l de ions bromat (Phillips et al., 2004) i molècules polars (Melin i Odegaard, 2000). Principalment són: bromits (Br^-), hipobromits (BrO^-) i bromats (BrO_3^-). Els ions bromurs reaccionen ràpidament amb l'ozó formant ions hipobromits. L'ió hipobromit pot tornar a reaccionar amb l'ozó formant ions bromats altra vegada. En ozonització perllongada, es generaran ions bromats, un ió estable de manera que pot ser acumulatiu i, per tant, tòxic pels organismes aquàtics (Figura 7). Aquests poden ser més d'un problema en sistemes de recirculació (Phillip et al., 2004; Zhang et al., 2005; Liltved et al., 2006).

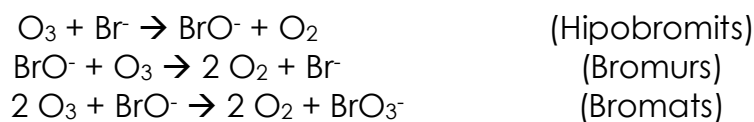


Figura 7: Formació de ions hipobromits i bromats en presència d'ozó (Grguric et al., 1994; Tyrovola i Diadamopoulos, 2005).

La presència de ions hipoclorit en l'aigua marina fa accelerar la reacció de formació de hipobromits, actuant com a catalitzador. Una part dels hipobromits ajudaran a millorar la formació de ions bromat (Grguric et al., 1994):



La vida mitja de l'ozó són "> 5 segons", mentre que la de BrO^- és de fins a 1 hora (Smith et al., 2003). És important, doncs, analitzar quin és el contingut de l'ió brom (Br^-) o l'ió hipobromit (BrO^-) abans de la

ozonització. Per a evitar la formació de bromats es pot actuar reduint el pH durant la generació d'ozó, reduint l'ozó residual, o bé, disminuint la concentració de ions bromit. Es pot actuar afegint amoní per a permetre la formació de bromamines enlloc de bromats (Yang et al., 1999; Phillip et al., 2004). L'amoní pot actuar com a nutrient pels bacteris nitrificants. També es poden eliminar tots aquests productes mitjançant l'ús de carbó actiu.

S'ha vist que la tolerància a aquests productes depèn de l'espècie; els crustacis semblen ser tolerants, en canvi, les larves de peix no (Smith et al., 2003).

1.4.2. Aplicacions de l'ozó

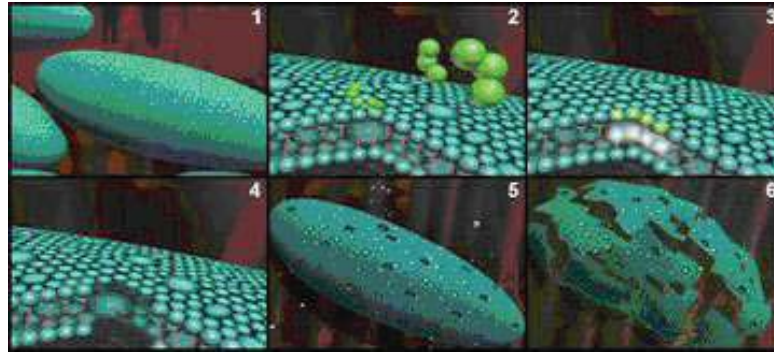
A nivell d'aquariologia, s'ha utilitzat i s'està utilitzant molt pels seus beneficis en l'aigua (Aiken, 2004). És un sistema totalment tancat i les reaccions d'oxidació-reducció cobren molta importància, a través de l'equilibri químic i biològic que s'implanta.

En l'aqüicultura, l'ozó s'utilitza pels efectes que produeix (Pla JACUMAR, 2005):

- **Per a desinfectar:** En recirculació, factors com treballar amb altes densitats de peixos, o realitzar el subministrament d'aigua directe d'aigües externes, provoca estrès en els peixos, un augment de la càrrega de nutrients en el sistema i facilita la proliferació d'organismes patògens. Per a evitar-ho, és bo utilitzar procediments de quarantena abans d'introduir els peixos, tractar l'aigua d'entrada i de sortida del sistema, o bé, utilitzar ozó per a desinfectar tota l'aigua del circuit o les instal·lacions.

L'ozó inactiva de forma efectiva una sèrie de bacteris, virus, fongs i protozous patògens (Ben-Atia et al., 2007; Ritar et al., 2006; Blogoslawski et al., 1973). L'efectivitat del tractament depèn del nivell de matèria orgànica en l'aigua, de la càrrega de patògens, de la concentració d'ozó utilitzada i del temps d'exposició (temps de contacte) de l'ozó. Si existeix una alta càrrega de matèria orgànica, les necessitats d'ozó per a oxidar-la podrien ser insuficients per a realitzar la desinfecció suficientment efectiva.

Degut al seu alt potencial d'oxidació, l'ozó oxida els components cel·lulars de la paret cel·lular dels bacteris. Un cop la molècula d'ozó entra en la paret cel·lular, oxida la resta de components essencials (enzims, proteïnes, DNA, RNA) i produeix la lisi de la cèl·lula (Dempsey, 2004), donant una disminució de la càrrega microbiana a l'aigua (Figura 8).



- 1 – Cèl·lula bacteriana generada per ordinador
- 2 – Les cèl·lules d'ozó penetren per la paret cel·lular del bacteri
- 3 – L'ozó entra en la paret cel·lular i provoca corrosió
- 4 – Efecte de l'ozó sobre la paret
- 5 – Cèl·lula bacteriana després d'estar en contacte amb diverses molècules d'ozó
- 6 – Lisi de la cèl·lula

Figura 8: Lisis de cèl·lules en presència d'ozó. Passos de la desinfecció amb ozó (Dempsey, 2004).

- **Per a reduir nitrits.** Quan la producció de nitrits és molt alta, es poden acumular en el sistema i ser tòxics per als peixos. Els bacteris associats a la conversió d'amoni a nitrits (*Nitrosomonas* sp) són més efectius quan la càrrega orgànica és elevada, que els bacteris que degraden el nitrit a nitrat (*Nitrobacter* sp) provocant un augment en els nivells de nitrit. L'ozó els redueix per oxidació a nitrat o reduint la càrrega orgànica, el que millora l'eficiència del biofiltre i la nitrificació (Bullock et al., 1997; Summerfelt i Hochheimer, 1997; Suantika et al., 2001). Tango i Gagnon (2003) va informar que la relació estequiomètrica necessària per a oxidar els nitrits a nitrats és de 1'04 mg d'ozó/mg nitrit.
- **Per a eliminar compostos orgànics, el color de l'aigua i la olor.** Els compostos orgànics dissolts, com els àcids húmics, provoquen coloració en l'aigua. No són biodegradables i s'acumulen en funció de l'alimentació, l'intercanvi de l'aigua en el sistema i la taxa d'eliminació dels residus. Nivells alts d'aquests compostos produeixen estrès en els peixos i redueixen l'eficiència del biofiltre. L'ozó els elimina mitjançant oxidació en productes que poden ser nitrificats en el biofiltre i mitjançant precipitació. Així, es poden eliminar mitjançant sedimentació o filtració convencional.

També és efectiu en l'eliminació d'algues i altres organismes planctònics i en l'eliminació del color, probablement perquè quan l'ozó reacciona amb la matèria orgànica ataca primer als compostos que contenen carboni amb dobles enllaços, entre ells,

la majoria de pigments (Figura 9). Disminueix també la mala olor de l'aigua (també s'elimina el mal gust de l'aigua), ja que s'oxida matèria orgànica, metalls pesats, sulfurs i substàncies estranyes.



Figura 9: Efectivitat de l'ozó en l'aigua marina, eliminant compostos orgànics i el color de l'aigua (a l'esquerra, aigua marina mantinguda en recirculació al dia 29 de cultiu i, a la dreta, aigua marina tractada amb ozó el dia 29 de cultiu). Font: Mòdul de tractament d'aigües v.1.2., IRTA de Sant Carles de la Ràpita.

- **Per a eliminar sòlids col·loïdals o molt fins.** Les partícules col·loïdals són les responsables de la torbesa de l'aigua, són partícules de la mateixa càrrega, de 1-30 micres i 0,001-1 micra, respectivament, que romanen en suspensió sent completament impossible la seva eliminació mitjançant mètodes mecànics de separació ja que es repelen entre sí (Aiken, 2004). La seva acumulació disminueix l'eficiència dels biofiltres i produeix estrès en els peixos. L'ozó els elimina mitjançant la microfloculació (Figura 10); és a dir, canviant la càrrega de les partícules, neutralitzant-les, fent que aquestes s'agreguin formant partícules més grans. Així sedimenten facilitant la seva eliminació i disminuint també la torbesa de l'aigua (Timmons et al., 1991; Summerfelt et al., 1997).

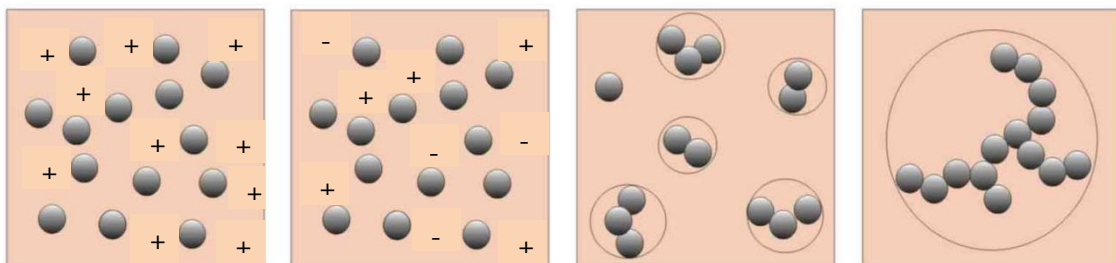


Figura 10: La microfloculació dels sòlids col·loïdals o molt fins mitjançant ozó (Dempsey, 2004).

- **Augmenta la quantitat d'oxigen dissolt.** L'ozó és un gas molt oxidant i, el fet de ser un gas molt volàtil, fa que reaccioni ràpidament amb altres elements presents en l'aigua. En trencar-se la molècula triatòmica de l'ozó (O_3), pot quedar una molècula diatòmica; és a dir, oxigen dissolt en l'aigua. D'aquesta manera, hi ha més oxigen en el tanc dels peixos (Philip et al., 2004). Per a evitar que quedi ozó residual és freqüent utilitzar filtres de carbó actiu, ja que adsorbeixen compostos orgànics, gasos dissolts o altres impureses (Lawson i Merry, 1991). La seva presència en el tanc de cultiu seria altament tòxic a baixos nivells, ja que l'ozó destrueix l'epiteli que cobreix les brànquies deixant l'organisme susceptible a infeccions microbianes (Bullock et al., 1997). Mesures per a evitar l'ozó residual són, per exemple el *protein-skimmer*; per això, la seva importància en un SRA.

1.4.3. Subministrament de l'ozó

L'ozó és produït a partir d'un gas que contingui oxigen, normalment aire, o bé oxigen pur. Si es subministra aire, s'ha de tenir en compte que l'eficiència del generador és de la meitat de quan es treballa amb oxigen, ja que l'aire conté un 21% d'oxigen aproximadament (Summerfelt, 2003). S'ha de tenir en compte que l' O_3 gas és molt corrosiu, pel que els components d'un SRA han de ser ozó-resistents (Lawson i Merry, 1991; Summerfelt i Hochheimer, 1997).

L'ozó es pot aplicar de manera contínua o discontinua, segons l'estratègia d'alimentació que s'apliqui al sistema. Quan s'alimenten els peixos, després de dos o tres hores es produeix un màxim en les concentracions d'amoni, matèria orgànica dissolta i altres productes, ja que es produeixen varis fenòmens alhora; la digestió, la respiració i la defecació. Si el peix s'alimenta varies vegades al dia, es poden aplicar tractaments d'ozó en discontinu després de cada ració. En canvi, si l'alimentació és al llarg de tot el dia, la qualitat de l'aigua es degrada de manera continuada i el tractament ha de ser en continu.

Si l'ozó s'utilitza per a la desinfecció s'ha de tenir en compte la quantitat de matèria orgànica present en l'aigua. En aigua pura les concentracions residuals d'ozó són de 0,01-0,1 ppm durant 15 segons, aquesta concentració és suficient per a reduir la càrrega bacteriana, però si la quantitat de matèria orgànica dissolta és alta, la quantitat d'ozó que s'ha de subministrar ha de ser major, ja que part de l'ozó s'utilitzarà per a flocular i precipitar aquesta matèria orgànica dissolta (Grguric et al., 1994).

Generalment es recomana concentracions de 0,1-0,2 ppm d'ozó residual i temps de contacte de 1-5 minuts per a aconseguir la desinfecció. En el cas d'aigües residuals, es recomana 0,2-0,4 ppm i 1-5 min. de tractament (Pla JACUMAR, 2005).

Per a la majoria d'organismes d'aigua dolça o marina, l'ozó residual en altes concentracions (0,01-0,1 ppm) és tòxic (Grguric et al., 1994), pel que s'ha d'escollir cuidadosament la ubicació des d'on s'aplicarà l'ozó al circuit (Lawson et al., 1991; Pla JACUMAR, 2005):

- **Introduint l'ozó amb l'oxigen.** Generalment, en SRA, l'oxigen s'aplica després del biofiltre i abans dels tancs de cultiu. Degut a la proximitat als tancs dels peixos, es recomana ficar una càmera de contacte (o de desozonització) en la que es reté l'aigua durant uns minuts. Si s'aplica d'aquesta manera, s'aconsegueix reduir la càrrega bacteriana i els nivells de nitrats just abans de subministrar-la als peixos.
- **Introduint l'ozó abans del biofiltre.** Aquesta opció és menys arriscada que l'anterior ja que hi ha menys risc d'exposició pels peixos a l'ozó residual (aquest seria utilitzat per a l'oxidació dels biofilms). Tanmateix, si els nivells d'ozó residual són massa elevats, l'eficiència del biofiltre es pot veure afectada reduint, així, la nitrificació.
- **Introduint l'ozó en l'aigua d'entrada.** Es preveu l'entrada de patògens al sistema, però no prevé la formació de matèria orgànica dissolta.
- **Introduint l'ozó en l'aigua de sortida.** Es recomana en sales on fan estudis d'agents patògens, ja que preveu una descàrrega de patògens a la sortida del sistema.

1.4.4. Ozó ambiental

Treballant en sistemes de recirculació s'ha de tenir en compte que poden haver-hi fugues o detectar-se errades en el sistema, pel que és de gran importància analitzar de manera periòdica l'ozó ambiental. Donat que la densitat de l'ozó en forma de gas és extremadament alta, s'ha de tenir en compte que en cas de fugues l'ozó s'acumularà a nivells baixos. Per tant, la zona ha de ser ventilada i s'ha de poder eliminar totalment l'ozó residual de l'ambient, ja que és extremadament tòxic i constitueix un risc per a la salut dels treballadors (ProMinent, OZVa Type 1 and 2, 2004). Per a evitar això, existeixen mètodes per a la detecció d'ozó en l'aire, que s'expliquen posteriorment.

S'han establert els valors de concentracions d'ozó ambiental per a protegir la salut humana i vegetal escrits en el Real Decret 1796/2003 (Aguayo et al., 2005). Per tant, és molt important saber que l'ozó és un gas amb un gran potencial oxidant a qualsevol compost orgànic.

Existeix una sèrie de normatives de seguretat, entre elles ZH 1/474, i DIN 19627, que són d'obligada aplicació si el generador d'ozó en funcionament té una capacitat superior a 2 g/h d'ozó, pel que s'ha d'instal·lar un detector d'alarma. El límit d'alarma del detector de gas pot ser programat a una concentració de 0,01 ppm i ha de ser connectat a indicadors d'advertència òptica i auditiva.

1.5. Generador d'ozó

L'ozó es pot generar per tres mètodes diferents: per electròlisi, per mitjà de llum ultraviolada (UV) i per descàrregues elèctriques.

L'electròlisi és un procés per a separar un compost en els elements que el componen, de manera que l'intercanvi catiònic de protons realitzi la generació d'ozó gas. La llum UV funciona molt bé però no proporciona altes concentracions, pel que fa que aquest mètode no sigui molt emprat. Les descàrregues elèctriques, és el mètode comercialment més utilitzat ja que proporciona nivells de concentració molt elevats (Bullock et al., 1997; Sharrer i Summerfelt, 2007). N'hi ha dos tipus: la descàrrega en corona i la descàrrega de barrera dielèctrica (DBD). Donat que la primera és molt inestable, la més utilitzada és la DBD, també anomenat descàrrega silenciosa.

1.5.1. Descàrrega de barrera dielèctrica (DBD)

Els generadors d'ozó que utilitzen l'efecte corona, han de treballar amb un transformador d'alt voltatge (per a transformar els 220 V a 25.000 Volts). Quan es treballa amb oxigen pur, aquest és conduït per un camp elèctric entre dos elèctrodes on es provoca una descàrrega elèctrica silenciosa (Figura 11). Les molècules d'oxigen són excitades generant àtoms; la unió de tres àtoms forma molècules d'ozó. En ser una reacció exotèrmica, el generador ha de constar d'un sistema de refrigeració amb aigua (o aire) per a eliminar el calor generat per la formació d'ozó en la càmera de gas del generador d'ozó i, així, evitar danys en les parts internes del generador.

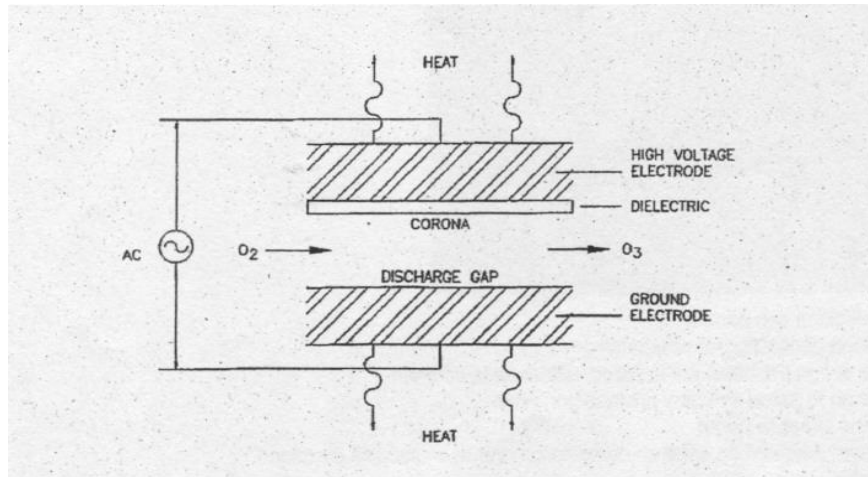


Figura 11: Descàrrega silenciosa per a la formació d'ozó a partir d'oxigen. Font: Pla JACUMAR, 2005.

En el cas que el subministrament sigui per mitjà d'aire, l'equip funciona igual que si s'alimentés amb oxigen però, a més a més, és recomanable que l'equip disposi dels següents components en l'ordre en que se'ls descriu: filtres de partícules d'aire a fi d'evitar les impureses, un manòmetre per a controlar la pressió (es necessita un compressor per a funcionar a 6-8 bars), dessecadors d'aire per a treure-li la humitat i un cabalímetre per a regular el cabal d'entrada al generador (veure Figura 14).

1.6. Metodologia per a mesurar l'ozó

Durant la ozonització és necessari analitzar l'ozó tant en fase líquida com gas per a determinar la dosi aplicada, l'eficiència de transferència i el nivell d'ozó residual. També hauria d'analitzar-se l'aire del voltant del generador d'ozó per a protegir als treballadors de possibles fugues o detectar alguna errada en el sistema.

Existeixen dos mètodes per a mesurar l'ozó:

- per **colorimetria**: mètodes per a la quantificació del color, que s'absorbeix a una longitud d'ona de 253,7 nm (Aguayo et al., 2005; Khadre et al., 2001).
- per **potencial reducció-oxidació** (redox, ORP): mètode en que es quantifica la capacitat de reduir o oxidar altres elements per transferència d'electrons.

Existeixen kits colorimètrics i tècniques espectrofotomètriques. Els resultats d'aquestes mesures acostumen a ser massa grollers com per a detectar nivells baixos que poden ser letals per als peixos i no són adequats si es volen fer mesures en continu, pel que generalment s'empren sondes que mesuren el potencial redox (en milivolts, mV) en l'aigua. Tot i això, la colorimetria és un bon mètode de mesura per a fer de manera discontinua o puntual en el sistema (Pla JACUMAR, 2005).

Per a analitzar amb kits colorimètrics s'utilitza el mètode *Indigo Blue* (Lawson i Merry, 1991), en el qual es necessita un blanc (una mostra d'aigua salada sense tractar, sense ozó) i una mostra (aigua salada tractada amb ozó). Les mostres s'agafen en ampolles de vidre de 20 ml on a dins hi ha el reactiu. Dins de l'aigua s'efectua la recollida de mostres. Tot seguit, es fa la lectura a l'aparell espectrofotomètric en mg/l. La intensitat del color de la mostra, depèn de la proporció d'ozó present (Hach DR/870, Mètode 8311 Ozó).

Per a mesurar el potencial redox (mV) es precisa de sondes redox. Aquestes no mesuren directament l'ozó dissolt, sinó que quantifiquen l'existència d'agents oxidants i reductors totals en un medi (la càrrega elèctrica d'una molècula dissolta en el medi és transformada per reaccions redox), pel que una sonda redox no té una determinació selectiva; doncs, és un mètode indirecte de determinació d'ozó residual en un medi (Tango i Gagnon, 2003). És un paràmetre poc específic, ja que depèn en gran mesura del pH de l'aigua. (http://www.prominent.es/desktopdefault.aspx/tabid-1489/183_read-2636/, 02-06-09).

Per tant, tenint la sonda en bon estat, calibrada i en funcionament (en funció del pH), es poden controlar els nivells totals d'oxidants presents en l'aigua, el que fa que també es controlin els nivells d'ozó.

Les sondes poden disposar d'un elèctrode d'or o de platí per a mesurar el potencial redox de l'aigua. Cal tenir en compte, que amb les d'or s'obté una lectura ràpida i real, en canvi amb les de platí la lectura és lenta podent durar uns minuts. En el moment que es tracta l'aigua amb ozó, pot ser que mentre s'estigui realitzant la lectura l'ozó reaccioni amb l'aigua donant una lectura no fiable.

La majoria dels sistemes que utilitzen ozó tenen connexions directes entre la sonda que mesura el potencial redox i el generador, de manera que aquest es connecta automàticament quan els nivells baixen i s'apaga quan s'aconsegueix el nivell "segur" (Pla JACUMAR, 2005).

Per a l'aqüicultura en aigua salada el nivell de potencial redox que es considera "segur" està en el rang d'entre 200 a 350 mV. Nivells per sota de 200-250 mV indica presència de toxicitat, però nivells de 400-450 mV també indiquen toxicitat degut a un medi massa oxidat, podent atacar teixits i cèl·lules d'éssers vius. El tractament amb ozó podria produir un augment del potencial redox; per tant, un medi confortable hauria de mantenir-se a uns 300-350 mV amb una bona regulació d'ozó (Lawson i Merry, 1991; Summerfelt i Hochheimer, 1997; Ritar et al., 2006).

Tot seguit, es mostra la corba de correlació teòrica entre la concentració d'ozó i el potencial redox (Figura 12) en aigua dolça.

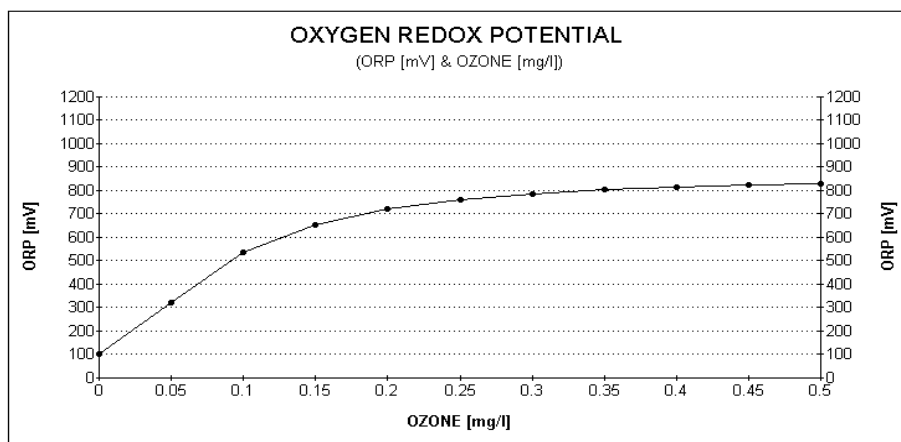


Figura 12: Corba de correlació teòrica entre la concentració d'ozó (mg/l) i el potencial redox (mV) en aigua dolça. Font: ProMinent.

2. OBJECTIUS

Objectiu general:

Avaluar l'efecte de l'ozó com a mètode de desinfecció i/o de reducció de les colònies bacterianes presents en l'aigua marina i com a medi per a reduir el contingut de compostos nitrogenats (amonis, nitrits i nitrats) dissolts en l'aigua com a conseqüència de l'excreció dels organismes marins, al mòdul v.1.2. de l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita sobre diferents organismes aquàtics en recirculació.

Objectius específics:

- Valorar els efectes de les diferents dosis d'ozó sobre el comportament, l'alimentació, i mortalitat i/o aparició de malalties de diferents espècies de peixos (orada, *Sparus aurata*; reig, *Argyrosomus regius*) en diferents estats de desenvolupament, sobre els paràmetres de l'aigua de cultiu i sobre la flora bacteriana present en l'aigua dels tancs de cultiu.
- Estudiar quin potencial redox és l'òptim per a què el cultiu del rotífer *Brachionus plicatilis* es mantingui estable o millori, sense afectar a la producció d'ous.
- Valorar els efectes de l'ozó sobre la vitalitat del rotífer (mortalitat, mobilitat i percentatge de femelles ovades) i sobre la flora bacteriana present en l'aigua de cultiu en 0,5, 1 i 2 minuts en aigua ozonitzada.
- Estimar l'efecte de diferents nivells d'ozó en el funcionament d'un biofiltre submergit i, en els paràmetres físico-químics de l'aigua de cultiu.

3. MATERIAL I MÈTODES COMUNS

3.1. Localització i descripció de les instal·lacions

Les proves realitzades per a dur a terme aquest treball es van fer a les instal·lacions de l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita, en els mòduls autònoms de tractament d'aigües v.1.2. (Figura 13). Aquests mòduls són sistemes de depuració d'aigües per a dur a terme un cultiu experimental que, a través d'un sistema de control de sondes i mecanismes de reacció, es controlen els paràmetres desitjats (cabal d'aigua del sistema en l/min, temperatura en °C i oxigen dissolt en mg/l).

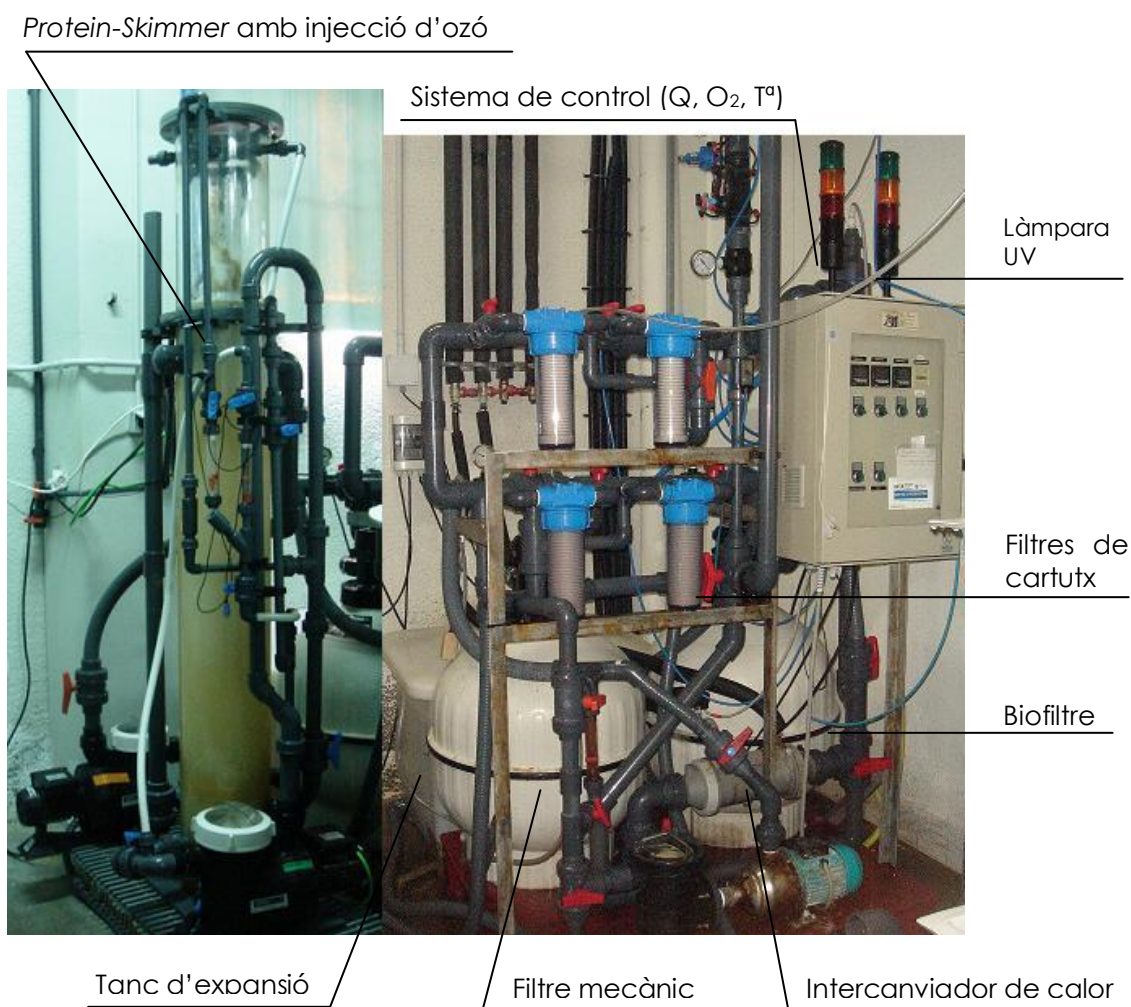


Figura 13: Mòdul autònom de tractament d'aigües v.1.2. de l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita.

Es van utilitzar dos mòduls de tractament d'aigües pels experiments; un mòdul control i, l'altre, un mòdul d'injecció d'ozó. Ambdós disposaven d'il·luminació individual sobre el tanc (fluorescents llum de dia), entrada d'aigua superficial per bombeig, dotada d'una columna de desgasificació i sortida mitjançant desguàs central connectat a la línia

de canonades que després de passar per un tanc d'expansió passa per un conjunt de filtres del mòdul de recirculació. Els dos sistemes de cultiu eren idèntics, amb la diferència que un d'ells constava d'una petita instal·lació de generació d'ozó. Les condicions en els dos mòduls eren les mateixes en cabal i temperatura, adequat al disseny de cada experiment.

Cada un dels mòduls constava de tres tancs de cultiu i, cada un d'ells tenia un volum total de 1500 litres, pel que cada mòdul tenia una capacitat volumètrica de 5000 l, 5 m³.

El procés de recirculació d'aigua és el següent (Figura 14): l'aigua de sortida dels tancs de cultiu es condueix mitjançant una bomba al *protein-skimmer*, per a l'eliminació dels components orgànics de l'aigua, on es realitza la injecció d'ozó. Una altra bomba fa recircular l'aigua dins del mateix. L'aigua entra en contacte amb l'ozó, es barreja i es deriva a un tanc d'expansió. Una tercera bomba, envia l'aigua ozonitzada cap el mòdul de recirculació passant per un filtre mecànic (de sorra) i un biofiltre ple de "biorings" (anelles de plàstic corrugat) sobre els que es desenvolupa una flora bacteriana rica en bacteris nitrificants que elimina els compostos nitrogenats de l'aigua. Es realitza una microfiltració per mitjà de filtres de cartutx de diferent micratge (depenent del tipus i mida de l'animal amb que s'està treballant), i s'esterilitza l'aigua amb una làmpara ultraviolada. L'aigua es tempera amb l'intercanviador de calor i finalment arriba als tancs de cultiu. Tota l'aigua circula per canonades de PVC.

L'ozó residual queda absorbit pels diferents filtres sense afectar al cultiu de peixos o qualsevol altre organisme aquàtic. Es creu que pot quedar ozó residual en altes dosis d'ozó aplicat (Bullock et al., 1997; Phillip et al., 2004), si no s'apliquen les mesures adequades (Lawson i Merry., 1991).

Cal destacar la importància del fraccionador d'escuma en SRA, ja que redueix la quantitat de sòlids en suspensió, nutrients excessius i terbolesa en un 20%, que altres elements del sistema no ho aconsegueixen (Timmons et al., 1991; Tango i Gagnon, 2003). També disminueix la densitat bacteriana de l'aigua en reduccions log₁₀ d'entre 0,08 i 0,10 (Phillips et al., 2004). Es considera, per tant, un procés de sistemes de tractament d'aigües (Suh et al., 1997). Segons Rosenthal (1980), la combinació de fraccionador d'escuma i ozonització és un bon mètode per SRA.

Tot seguit, es mostra l'esquema del funcionament del sistema de recirculació v.1.2. de l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita, on el subministrament d'ozó es realitzava en una càmera de contacte, en el fraccionador d'escuma i de manera discontinua.

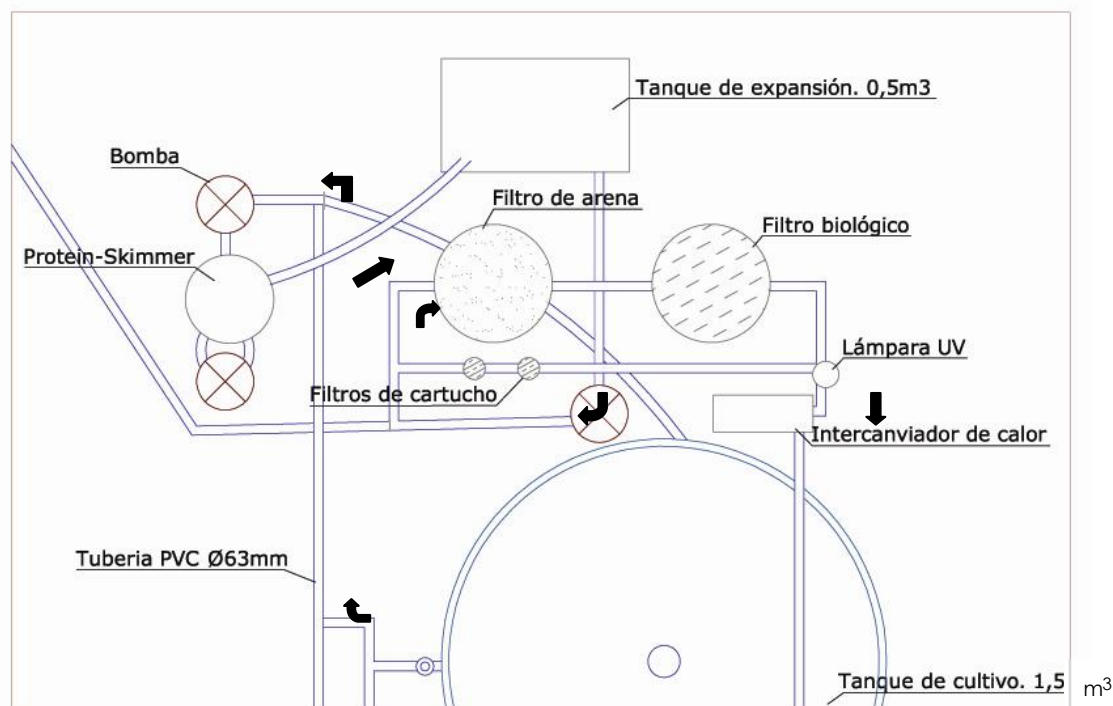


Figura 14: El mòdul autònom de tractament d'aigües v.1.2. de l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita en planta, detallant els elements del sistema.

3.2. Equips i material utilitzat

Per a dur a terme els diferents experiments es disposava de dos generadors d'ozó, que els dos treballaven segons el mètode de descàrrega de barrera dielèctrica (DBD).

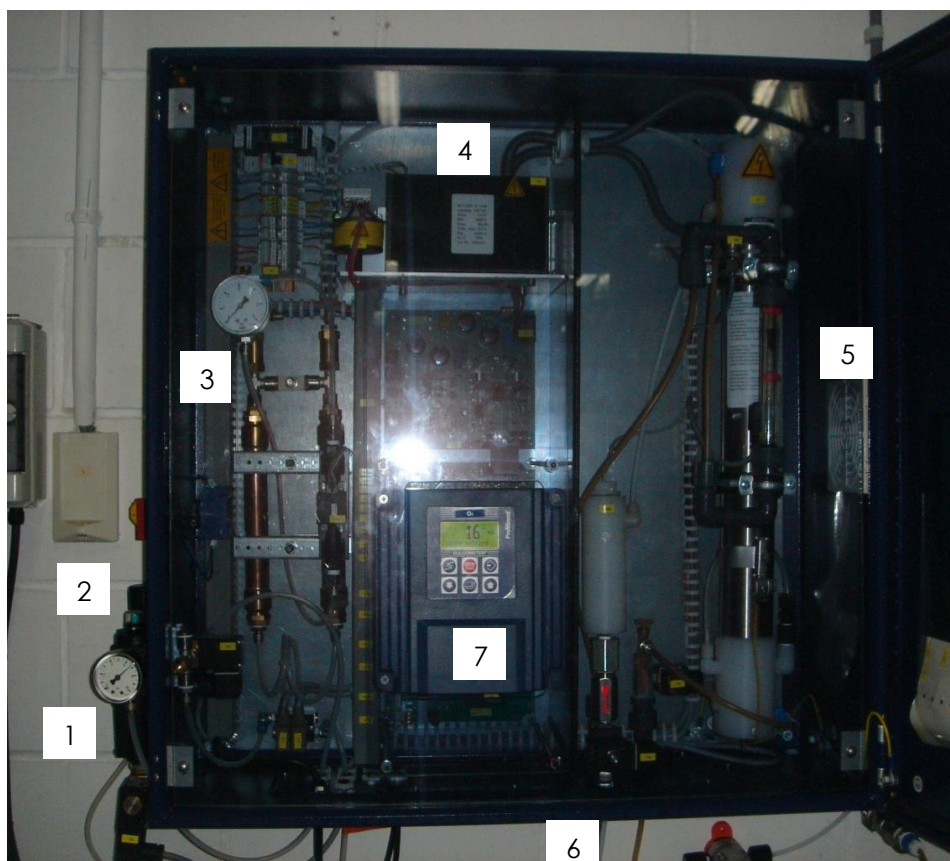
Un dels generadors d'ozó (Erwin Sander S1000 mg Alemanya) tenia una capacitat de generació d'ozó de 1000 mg/h. L'equip utilitzava aire per a generar ozó i la injecció d'ozó era en continu.

Aquest generador d'ozó es va utilitzar donant diferents dosis d'ozó (Taula 3) en el mòdul experimental d'injecció d'ozó, de manera que hi havia 6 nivells, al que teòricament corresponen a:

Taula 3: Equivalències de valors en el generador d'ozó Erwin Sander.

Nivell ozó	mg/h O ₃
0	0
1	167
2	333
3	500
4	667
5	833
6	1000

L'altre generador d'ozó (OZONFILT® OZVa de tipus 1 i 2 ProMaqua, Figura 15) amb una capacitat de 5 g/h, utilitza aire comprimit per a generar ozó de manera discontinua. Aquest equip té incorporat un controlador (Dulcomarin II DXCAW051MAPSES de ProMinent) des d'on es programen els paràmetres desitjats. Aquest controlador té diverses sondes connectades: tres sondes redox (RHEP-Au-SE de ProMinent) amb elèctrode d'or, una sonda de pH (PHER-112-SE de ProMinent) i una sonda de temperatura (model PT100). Aquest equip consta també de dos controladors auxiliars (mòdul Dulcometer CAN DXMAMW05EN01) per a portar un control exhaustiu tenint diferents punts de lectura de potencial redox dins del mateix mòdul. El controlador general té un registre continu de dades en una targeta SD. La instal·lació disposava, a més a més, d'un compressor (LXF06 230V/50 Hz de ProMinent).



1. Entrada d'aire i manòmetre
2. Filtres de partícules d'aire
3. 2 dessecadors d'aire
4. Transformador d'alt voltatge
5. Sistema de refrigeració d'aigua
6. Sortida d'O₃
7. Controlador electrònic

Figura 15: Generador d'ozó OZONFILT® OZVa de tipus 1 i 2 amb una capacitat de generació d'ozó de 5 g/h amb tots els seus elements. Font: Mòdul de tractament d'aigües v.1.2., IRTA de Sant Carles de la Ràpita.

Junt amb els generadors d'ozó, s'ha de disposar d'un sistema de detecció d'alarma d'ozó ambiental (GIG de 3 ppm d'O₃) com a mesura de seguretat donat que l'ozó és tòxic pels humans quan se supera un determinat líndar.

El seguiment dels paràmetres de l'aigua es feia amb una sonda multiparamètrica YSI 556 MPS a diari. Es mesurava el pH, l'oxigen dissolt en aigua (en mg/l), salinitat (parts per mil, ‰), temperatura (°C) i potencial redox (ORP, en mV).

Pel que fa a la qualitat de l'aigua, es va optar per el mètode colorimètric utilitzant l'aparell *Hach Colorimeter DR/870* per a mesurar el nivell d'amoni, nitrats i nitrats (en mg/l) dissolts en l'aigua, clor i brom lliure (en mg/l), terbolesa (en FAU), sòlids en suspensió (SST ó TDS en mg/l) i i potencial redox (en mg/l) d'acord amb les instruccions del fabricant. Aquests paràmetres, s'analitzaven 3 cops per setmana.

Cal destacar que la determinació de clor i brom lliure es realitzava segons el mètode DPD (N,N-dietil-p-fenilen diamina), un mètode colorimètric que dona els resultats com a residus totals oxidants en mg/l (Buchan et al., 2005; Ritar et al., 2006). Aquesta tècnica pot patir interferències degudes a halògens lliures, terbolesa, coloració i presència elevada de matèria orgànica en la mostra a valorar (Lawson i Merry, 1991; Fernández et al., 2001).

Es portava un control periòdic de la bacteriologia de l'aigua realitzant sembres 2 cops per setmana. Es recollien mostres d'aigua dels tancs de cultiu en vasos esterilitzats a 12 cm de profunditat de la superfície. La mostra es sembrava per sembra directe, o bé diluïdes en aigua de mar estèril, des de 10⁻¹ a 10⁻⁵. De cada dilució preparada es sembraven 100 µl per duplicat en agar marí (subministrat per Scharlau), agar de tripticaseïna i soja (TSA) amb un 2% de clorur sòdic (subministrat per Scharlau) per a poder enumerar el total de colònies bacterianes presents en l'aigua i en medi *tiosulfat citrat bile sal* (TCBS, subministrat per Panreac) selectiu per a bacteris vibrionacis (patògens oportunistes) preparats d'acord amb les instruccions del fabricant. Les plaques sembrades s'incubaven durant 24 hores a 28°C, realitzant després un recompte de nombre de colònies formades (UFC/ml) a cada placa.

En el recompte de colònies bacterianes es van considerar les dil·lucions, les quals amb les plaques presentaven recomptes entre 30 i 300 colònies (Díaz et al., 1999), el valor que està fora d'aquest rang, es considera un valor indicatiu.

3.3. Anàlisi estadística

Les anàlisis estadístiques es van dur a terme amb el software estadístic Sigma Stat (Systat Software, Inc., Point Richmond, CA, USA).

Gran part de les dades d'aquest treball no segueixen una distribució normal degut a la escassetat de dades. Per aquest motiu, es van normalitzar les dades mitjançant la transformació \log_{10} .

Les anàlisis efectuades van ser amb *t* de Student. La significança estadística de les diferències es va establir a un nivell de 5% ($P < 0,05$) per a cada grup de comparacions.

4. CAPÍTOL I: EXPERIMENTACIÓ AMB PEIXOS

Es va treballar amb dos espècies de peixos diferents. En el primer cas es va experimentar amb orada adulta (*Sparus aurata*) de 150 g de pes mig, en el segon cas amb alevins de reig (*Argyrosomus regius*) de 9 i 16,5 g de pes viu mig i, per últim, amb juvenils d'orada (*Sparus aurata*) de 53,36 g de pes mig.

L'objectiu era avaluar el nivell màxim de tolerància dels peixos a diferents dosis d'ozó, veient els possibles efectes sobre l'animal, tant en el que es refereix a comportament, alimentació, mortalitat i/o aparició de malalties, a fi de poder establir els rangs de treball posteriors. A més a més, s'analitzava l'aigua de cultiu per a valorar l'efecte de l'ozó com a mètode de desinfecció.

4.1. Experiment 1/Orada adulta

L'objectiu d'aquesta prova era avaluar l'efecte de l'ozó sobre orades adultes (comportament, alimentació, mortalitat i/o aparició de malalties) i sobre la flora bacteriana present en l'aigua dels tancs de cultiu.

4.1.1. Material i mètodes

Cultiu experimental

Es van utilitzar orades de 150 g de pes viu provinents de l'IRTA. Tant en el mòdul control com en el d'injecció d'ozó la biomassa d'orades era de 4 kg/m³ d'aigua en el tanc de cultiu (una densitat de 40 individus per tanc), repartit en tres tancs de 1,5 m³.

Disseny experimental i condicions de cultiu

El generador d'ozó utilitzat va ser l'Erwin Sander S1000 mg. Es van marcar sis nivells diferents de generació d'ozó, de 0 a 1000 mg/h, pel que cada augment de dosi era d'uns 166 mg/h aproximadament. El cabal d'aire d'entrada era de 10 l/h (veure Taula 3).

L'experiment va durar tres setmanes. Cada dos dies s'augmentava un nivell la dosi d'ozó subministrada als peixos (els nivells de 0 a 6 que tenia el generador i que equivalen a nivells majors de subministrament d'ozó). Els últims dos dies es va treballar a un nivell màxim de generació d'ozó però amb el cabal d'aire d'entrada a 20 l/h. L'alimentació va ser *ad-libitum* amb un pinso de creixement estàndard (Skretting) de mida D4, perquè no fos un factor limitant pel que fa al creixement.

En el mòdul control i en el d'injecció d'ozó el cabal era de 64 l/h i la temperatura era de 24°C (temperatura en que l'animal està fisiològicament més actiu). Per als dos mòduls es tenia un registre de dades en continu dels nivells d'oxigen dissolt en l'aigua, la temperatura i el cabal en els dos mòduls.

Controls

A l'inici i al final de l'experiment es van pesar els peixos obtenint un pes mig per a cada mòdul i, per tant, la seva biomassa. S'observaven a diari per a comprovar que el comportament i la natació fossin els normals. Un cop finalitzat l'experiment, es va procedir al sacrifici dels animals per xoc tèrmic.

Es controlaven els paràmetres físico-químics de l'aigua (pH, salinitat, temperatura, oxigen i potencial redox) a diari amb la sonda YSI per a portar un control. Tres cops per setmana es mesuraven els següents paràmetres amb el colorímetre Hach: amoníac, nitrats, nitrits, terbolesa, sòlids en suspensió, clor i brom lliure. Pel control microbiològic de l'aigua de cultiu, dos vegades a la setmana es realitzaven sembres en medi agar marí, fent 24 hores més tard el recompte del nombre de colònies de les plaques; en total, es van fer cinc sembres durant la prova.

4.1.2. Resultats i discussió

Pel que fa als resultats, es comentaran primerament els paràmetres de l'anàlisi d'aigües i, tot seguit, es comentaran els factors que afecten al cultiu experimental.

Al llarg de l'experiment, amb una duració de 23 dies de cultiu, es va dur un seguiment dels **paràmetres físico-químics** de l'aigua (Taula 4.1 i Taula 4.2). La taula mostra el nivell d'ozó aplicat en l'aigua de cultiu ("Qx2" vol dir nivell màxim de dosificació d'ozó, però amb el doble cabal d'aire d'entrada).

Taula 4.1: Paràmetres físico-químics de l'aigua de cultiu en el mòdul control.

Dia cultiu	Nivell ozó	pH	O ₂ (mg/l)	Sal ‰	T (°C)
1	0	7,03	4,64	32,15	24,15
2	0	7,14	4,80	32,04	24,25
3	0	7,30	4,83	32,10	24,12
4	0	7,17	2,98	32,07	24,38
5	0	7,01	2,91	32,06	24,32
8	0	7,39	4,34	32,25	24,07
9	0	7,32	4,22	32,30	24,25

10	0	7,23	4,46	32,32	24,16
11	0	7,10	3,53	32,34	23,92
12	0	7,19	4,52	32,33	23,87
15	0	7,06	3,83	32,53	23,82
16	0	6,94	4,93	32,61	23,88
18	0	7,07	4,36	32,56	23,93
19	0	7,07	4,27	32,57	24,06

Taula 4.2: Paràmetres físico-químics de l'aigua de cultiu en el mòdul d'injecció d'ozó.

Dia cultiu	Nivell ozó	pH	O ₂ (mg/l)	Sal ‰	T (°C)
1	0	7,10	4,65	32,31	24,86
2	0	7,06	4,22	32,23	25,05
3	1	7,24	5,75	32,30	24,94
4	1	7,23	6,35	32,35	24,87
5	2	7,15	6,54	32,34	24,94
8	3	7,47	6,12	32,46	24,67
9	3	6,88	6,80	32,45	24,84
10	4	7,19	6,20	32,47	24,57
11	4	7,34	5,40	32,48	24,46
12	5	7,35	5,44	32,45	24,47
15	6	7,23	5,22	32,60	24,25
16	6	7,16	6,19	32,63	24,35
18	Qx2	7,10	6,06	32,61	24,33
19	Qx2	6,97	6,74	32,62	24,41

El pH, en els dos casos es manté entre 7 i 7,5, un valor adequat i estable però inferior a l'habitual en aigua salada, aproximadament 8 (Wurst i Durborow, 1992). L'experiència ens diu que a l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita, amb el temps, la recirculació porta a un pH més aviat àcid, ja que el pH és afectat per l'equilibri carbonats-bicarbonats, aproximadament 7,5. Es van donar diferències en la concentració d'oxigen dissolt: $\leq 4,5$ mg/l en el mòdul control, i $\geq 4,5$ mg/l en el mòdul d'injecció d'ozó. L'oxigen dissolt en el mòdul control és baix probablement degut a la temperatura més que a la càrrega mantinguda en els tancs, ja que el nombre de peixos per tanc és molt baix (Henry i González, 2008). La concentració d'oxigen és fins a un 50% més elevada en el mòdul d'injecció d'ozó per la presència d'aquest que, amb el temps, reacciona amb altres sals dissoltes en l'aigua i es transforma en oxigen, afavorint així les condicions ambientals del cultiu experimental (Bullock et al., 1997; Summerfelt et al., 1997; Phillip et al., 2004; Aveiga i Costa, 2009). La salinitat és la mateixa en els dos casos. Pel que fa a la temperatura, es manté estable sobre els 24°C, per a mantenir les orades en plena activitat.

Es va determinar la quantitat de nitrogen dissolt en l'aigua en forma d'amoni, nitrits i nitrats en els dos mòduls (Figura 16).

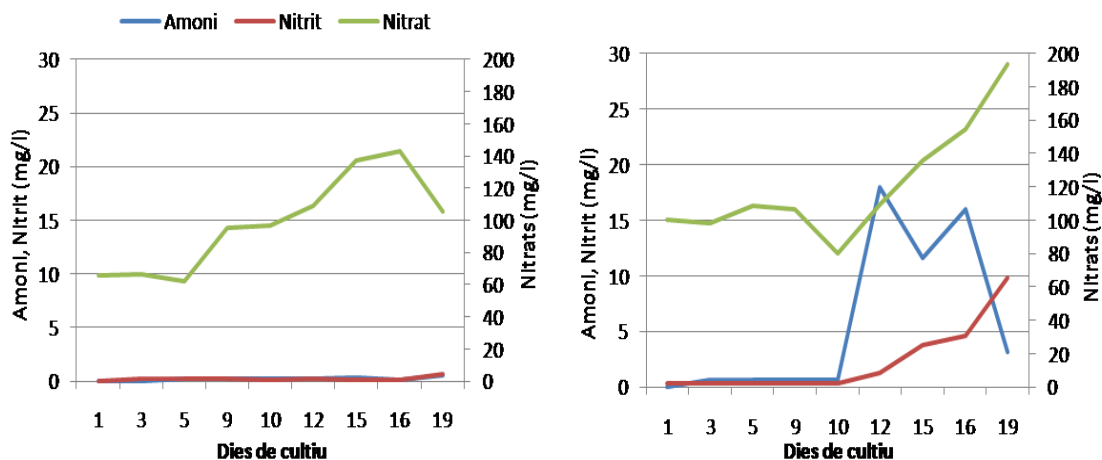


Figura 16: Evolució del nitrogen dissolt en l'aigua en forma d'amoni, nitrits i nitrats en mg/l, en el mòdul control (esquerra) i en el mòdul d'injecció d'ozó (dreta).

Els bacteris nitrificants que transformen l'amoni en nitrit, i aquest en nitrat, tenen una evolució lleugerament diferent entre el mòdul control i el mòdul d'injecció d'ozó. Els canvis es mostren a partir del nivell 4 d'ozó (veure taula 3) i a partir del dia 14 de cultiu fins el dia 19. El dia 12 de cultiu, l'amoni en el mòdul de l'ozó va ser 18 vegades més gran que en el control; el dia 15 de cultiu en el mòdul de l'ozó, el nitrit és 32 vegades major respecte el control; i per últim, el dia 19 es mostra una diferència de nitrats de 1,8 vegades major el mòdul de l'ozó respecte el control. Aquests compostos anaven augmentant de concentració de manera successiva.

Tenint en compte el pH observat durant el cultiu, el TAN produït està en forma ionitzada (poc tòxic) d'amoni en un 98,95% (Chen i Lin, 1995; Losordo, 2004). L'1,05 % restant estava en forma d'amoni no ionitzat (molt tòxic) que puntualment va assolir una valor de 18 ppm, ja que el filtre mecànic s'obstruïa ràpidament.

La obstrucció del filtre mecànic en el mòdul d'injecció d'ozó seria la causa de l'augment en nitrits i, conseqüentment, en nitrats. Una altra causa, podria ser l'alimentació, que a diferència del mòdul control, els peixos van consumir més pinso. Es creu que per això, la concentració d'ozó aplicada a l'aigua no ha tingut cap efecte en la reducció de nitrits i nitrats (Phillip et al., 2004).

Altres paràmetres determinats en aquest experiment van ser: sòlids en suspensió (SST), terbolesa (FAU), clor i brom lliure (mg/l). En la taula 5 es mostren els resultats obtinguts en els dos mòduls.

Taula 5: Evolució dels paràmetres sòlids en suspensió (SST), terbolesa, clor i brom lliure (mg/l) en els dos mòduls de tractament d'aigües.

Sense ozó					Amb ozó				
Dia cultiu	SST	Terbolesa	Cl lliure	Br lliure	Nivell ozó	SST	Terbolesa	Cl lliure	Br lliure
1	25	5	0,07	0,14	0	39	5	0,00	0,04
3	12	0	0,10	0,08	1	6	0	0,06	0,06
5	47	3	0,10	0,09	2	95	4	0,07	0,05
9	9	0	0,05	0,08	3	14	0	0,01	0,13
10	12	0	0,10	0,11	4	55	3	0,07	0,03
12	14	0	0,12	0,11	5	2	0	0,17	0,22
15	9	1	0,11	0,13	6	15	1	0,16	0,06
16	49	0	0,01	0,33	6	0	0	0,06	0,26
19	16	3	0,08	0,26	Qx2	14	0	0,22	0,14

En cap d'aquests paràmetres no es veu una tendència clara. Possiblement el colorímetre Hach no era l'aparell adequat per a mesurar aquests paràmetres, sinó que se'n necessitaria un de més acurat i selectiu per què no hi haguessin possibles interferències durant la valorització dels paràmetres (Fernández et al., 2001). Per exemple, el clor pot patir interferències de brom, cloramines, manganès oxidat, crom oxidat i peròxids (Hach DR/820).

Visualment els mòduls sí que indicaven ser diferents, ja que el mòdul control tenia un color més verdós d'aigua de mar, a diferència del mòdul d'injecció d'ozó que es caracteritzava per a tenir un color blau cristal·lí. El procés d'oxidació de l'ozó elimina el color i genera molècules orgàniques altament biodegradables (Tango i Gagnon, 2003). Otte and Rosenthal (1979) ho atribueixen a la utilització d'un fraccionador d'escuma i biofiltració en un sistema de recirculació.

Fent referència al potencial redox se'n van prendre mesures diàries. La taula 6 mostra el nivell d'ozó aplicat i la lectura real a l'aigua de cultiu. Curiosament els nivells evolucionen de manera paral·lela degut a la sonda multiparamètrica utilitzada, ja que disposava d'un elèctrode de platí. Aquests tenen una resposta lenta, pel que l'ozó ja hauria reaccionat amb l'aigua i la lectura no seria vàlida. Pel contrari, les sondes redox de lectura ràpida són les que disposen d'un elèctrode d'or, que enseguida dóna lectura, una lectura de valor real.

Taula 6: Evolució del potencial redox (mV) en els sistemes de cultiu.

Dia cultiu	Nivell ozó	Sense ozó	Amb ozó
1	0	136	135,3
2	0	266,4	280,8
3	1	241,7	227,3

4	1	139,7	128,2
5	2	98,9	93,8
8	3	94,5	93,3
9	3	82,1	87,6
10	4	76,3	81,3
11	4	70,6	73
12	5	93,8	96,9
15	6	119,2	116,8
16	6	134	178,3
18	Qx2	67,9	93,6
19	Qx2	161,5	166,4

Els resultats referents a la **càrrega bacteriana** present en l'aigua de cultiu es mostren a la taula 7, en unitats formadores de colònies per ml (UFC/ml) en el mòdul control i en el mòdul d'injecció d'ozó.

Taula 7: Evolució de la càrrega microbiana (UFC/ml) en els tancs de cultiu d'ambdós mòduls.

Dia cultiu	Nivell ozó	Sense ozó	Amb ozó
2	0	6,E+03	7,E+03
4	1	9,E+03	6,E+02
9	3	7,E+04	7,E+04
12	5	2,E+05	2,E+04
18	Qx2	7,E+04	4,E+03

No s'observen diferències significatives (U-Mann-Whitney, $N=5$, graus de llibertat=4, $T=33$, $P = 0,310$) en el nombre de colònies de bacteris presents en l'aigua de cultiu després de realitzar el tractament amb ozó. Tot i això, s'observa una tendència descendent en el mòdul d'injecció d'ozó.

Pel que fa al control del **creixement** dels peixos al llarg dels 23 dies d'experiment, no s'han vist diferències significatives (U-Mann-Whitney, $N=2$, graus de llibertat=1, $T=4,5$, $P = 0,667$).

Taula 8: Resultats de biomassa (kg/m^3) obtinguts en l'Experiment 1/Orades adultes.

		Sense ozó	Amb ozó
Inici experiment	T1	4,00	4,00
	T2	4,00	4,00
	T3	4,00	4,00
Final experiment	T1	5,07	5,17
	T2	4,86	4,90
	T3	4,97	5,03

En aquest experiment no hi va haver **mortalitat** en cap dels dos mòduls.

La **natació** dels peixos en el mòdul control i en el mòdul d'injecció d'ozó era normal, nedant tots en el mateix sentit i amb la mateixa velocitat en el tanc de cultiu.

Malgrat tot, el **comportament** en el mòdul d'injecció d'ozó era lleugerament diferent al del mòdul control. A mida que s'augmentava la dosi d'ozó en l'aigua, els peixos estaven més actius, més nerviosos i aparentment més famolencs perquè en donar de menjar donaven símptomes de voler-ne més, encara que no es van detectar diferències en el creixement entre els dos mòduls.

Durant l'experiment no es va observar cap anomalia ni aparició de malalties en cap dels dos mòduls.

4.2. Experiment 2/Alevins de reig

L'objectiu d'aquesta prova era el mateix que l'anterior, però realitzat amb una altra espècie, alevins de reig, i en estat de desenvolupament diferent, d'entre 9 i 10 g de pes viu.

4.2.1. Material i mètodes

Cultiu experimental

Es van utilitzar alevins de reig provinents de l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita. En el mòdul control hi havia alevins de 16,64 g de pes mig, amb una biomassa de 5,66 kg/m³ repartit en tres tancs de 1,5 m³ i una biomassa total de 8,5 kg (una densitat de 500 individus per tanc). En el mòdul d'injecció d'ozó els alevins tenien un pes de 9,14 g de mitjana, amb una biomassa de 5,43 kg/m³ repartit en tres tancs de 1,5 m³ i una biomassa de 8,14 kg (una densitat de 890 individus per tanc).

Disseny experimental i condicions de cultiu

El generador d'ozó utilitzat va ser l'Erwin Sander S1000 mg. Es van marcar sis nivells diferents de generació d'ozó (com en la prova anterior), de 0 a 1000 mg/h, pel que cada augment de dosi era d'uns 166 mg/h aproximadament. El cabal d'aire d'entrada era de 10 l/h (veure Taula 3).

L'experiment va durar tres setmanes. Cada dos dies s'augmentava un nivell la dosi d'ozó subministrada als peixos (els nivells de 0 a 6 que tenia el generador i que equivalen a nivells majors de subministrament d'ozó). A diferència de l'experiment anterior, els últims dos dies no es va augmentar el cabal d'aire d'entrada a 20 l/h, ja que els peixos es van veure sèriament afectats per l'ozó. L'alimentació era *ad-libitum* amb pinso de mida D2 de Skretting perquè no fos un factor limitant pel que fa al creixement.

En el mòdul control i en el d'injecció d'ozó el cabal era de 64 l/h i la temperatura era de 24,5°C (temperatura en que l'animal està fisiològicament més actiu). Durant l'assaig, es tenia un registre de dades en continu dels nivells d'oxigen per a l'oxigen dissolt en l'aigua, la temperatura i el cabal en els dos mòduls.

Controls

Previ a l'experiment, es va dur a terme un mostreig per a saber-ne el pes mig. En començar la prova, es va realitzar un recompte de tots els animals que entraven en cada un dels mòduls. Durant l'experiment es va dur un control de la mortalitat en els tancs de cultiu.

Es controlaven els paràmetres físico-químics de l'aigua (pH, salinitat, temperatura, oxigen i potencial redox) a diari amb la sonda YSI per a portar un control. Tres cops per setmana es mesuraven els següents paràmetres amb el colorímetre Hach: amonis, nitrits, nitrats, terbolesa, sòlids en suspensió, clor i brom lliure. Pel control microbiològic de l'aigua de cultiu, dos vegades a la setmana es realitzaven sembres en medi d'agar marí, fent 24 hores més tard el recompte del nombre de colònies de les plaques.

4.2.2. Resultats i discussió

Al llarg de l'experiment, amb una duració de 25 dies de cultiu, es va dur un seguiment dels **paràmetres físico-químics** de l'aigua (Taula 9.1 i Taula 9.2). La taula mostra el nivell d'ozó aplicat en l'aigua de cultiu.

Taula 9.1: Paràmetres físico-químics de l'aigua de cultiu en el mòdul control.

Dia cultiu	Nivells ozó	pH	O ₂ (mg/l)	Sal (‰)	T (°C)
1	0	6,99	4,32	31,42	24,53
2	0	6,98	4,21	31,48	24,64
3	0	6,98	3,81	31,51	24,90
4	0	6,99	4,48	31,55	24,83
5	0	6,96	3,99	31,61	24,56
8	0	6,94	4,68	31,77	24,48
9	0	6,83	4,41	31,78	24,42
10	0	7,08	3,61	31,70	24,30
11	0	6,90	4,12	31,70	24,32
12	0	6,80	4,69	31,69	25,03
17	0	6,81	4,00	31,75	25,15
18	0	7,06	6,19	32,63	24,35
19	0	6,71	3,99	31,72	25,16
22	0	6,81	4,44	31,83	25,02
23	0	6,72	3,65	31,76	24,82
24	0	6,67	3,12	31,70	24,72
25	0	6,87	3,45	31,64	24,58

Taula 9.2: Paràmetres físico-químics de l'aigua de cultiu en el mòdul d'injecció d'ozó.

Dia cultiu	Nivells ozó	pH	O ₂ (mg/l)	Sal (‰)	T (°C)
1	0	7,09	4,21	31,38	24,65
2	0	7,08	4,49	31,41	24,79
3	1	7,07	7,37	31,45	25,05
4	1	7,04	6,90	31,47	24,98
5	2	6,96	7,24	31,52	24,78
8	3	6,86	8,51	31,63	24,70
9	3	6,75	6,23	31,57	24,52
10	4	6,79	6,57	31,61	24,63
11	4	6,86	5,93	31,50	24,50
12	5	6,72	6,51	31,48	24,95
17	6	6,95	5,69	30,73	25,15
18	6	6,93	4,95	30,99	25,06
19	0	6,93	4,95	30,99	25,29
22	0	6,82	4,15	31,26	25,16
23	0	6,80	4,86	31,17	25,22
24	0	6,86	4,63	31,15	25,16
25	0	6,91	4,83	31,18	25,09

S'ha de tenir en compte, que no es va augmentar el doble el cabal d'entrada d'aire del generador d'ozó, ja que el cultiu es va veure sèriament afectat en el nivell 6 d'ozó. Per aquest motiu, el generador d'ozó es va parar el dia 19 de cultiu i es va seguir amb la determinació dels paràmetres com durant l'experiment, per a observar una possible recuperació dels peixos.

Els paràmetres físico-químics es comporten de la mateixa manera que en l'experiment anterior (veure apartat 4.1.2.), amb la diferència que l'oxigen dissolt en el mòdul d'injecció d'ozó disminueix amb el temps degut a la qualitat de l'aigua.

Amb el primer augment d'ozó, s'observa un augment brusc de l'oxigen dissolt (de 4,49 a 7,37 mg/l d'O₂), que es manté en alts nivells fins el dia 18 de cultiu (Bullock et al., 1997; Phillip et al., 2004). Coincidint en el temps, el dia 18 fins el dia 20 de cultiu hi ha una mortalitat del 25 % respecte la població inicial. Això vol dir, que en molt poc temps la qualitat de l'aigua va empitjorar fent disminuir l'oxigen dissolt de l'aigua, el procés de putrefacció de les baixes i l'estrès provocat per l'efecte de l'ozó augmentant la respiració dels peixos. A partir del dia 22, l'oxigen es va mantenir a uns nivells adequats en absència d'ozó.

Es va determinar la quantitat de nitrogen dissolt en l'aigua en forma d'amoni, nitrits i nitrats en els dos mòduls. Els resultats es mostren a la figura 17.

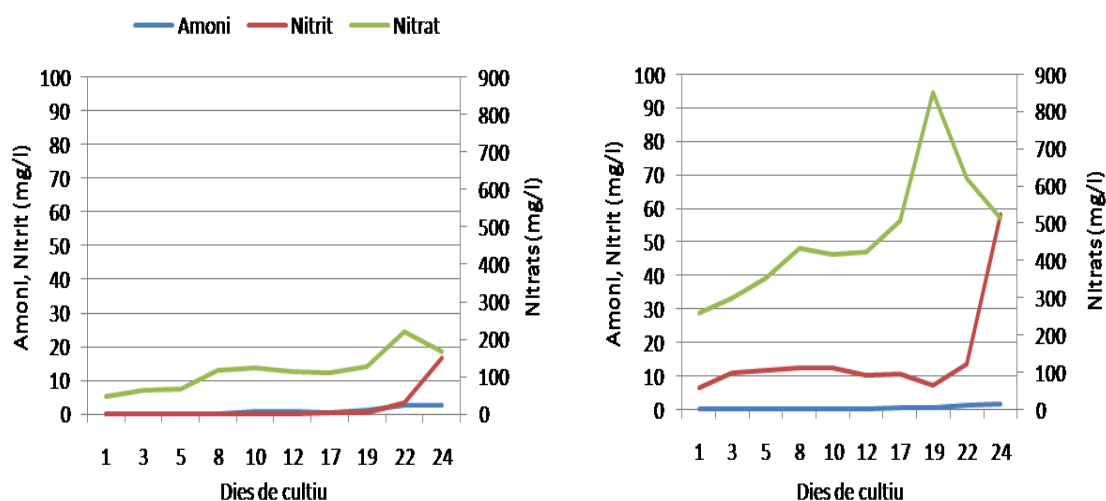


Figura 17: Evolució del nitrogen dissolt en l'aigua en forma d'amoni, nitrits i nitrats en mg/l, en el mòdul control (esquerra) i en el mòdul d'injecció d'ozó (dreta).

En aquest cas, els gràfics mostren uns biofiltres poc carregats en bacteris nitrificants. Mostren diferències entre nitrits i nitrats. Es destaca el dia 8 de cultiu, on l'ozó multiplica la concentració de nitrit en 100 vegades. Pel que fa el nitrat, té concentracions superiors en el mòdul de l'ozó, ja que com més nitrit es genera, més nitrat s'acumula al sistema. És possible, com en l'experiment anterior, que la diferència que existeix entre els dos mòduls sigui degut a l'alimentació dels peixos. Es creu que per això, la concentració d'ozó aplicada a l'aigua no ha tingut cap efecte de reducció de nitrits i nitrats (Phillip et al., 2004).

Tenint en compte el pH observat durant el cultiu, el TAN produït està en forma ionitzada (poc tòxic) d'amoni en un 99,485 % (Chen i Lin, 1995; Losordo, 2004). El 0,515 % restant estava en forma d'amoni no ionitzat (molt tòxic).

De la mateixa manera, el fet que l'aigua no estigués del tot neta i clara per l'alimentació i la mortalitat diària, possiblement l'ozó va reaccionar amb més facilitat amb els compostos dissolts de l'aigua de cultiu que amb els bacteris nitrificants un cop passat el circuit de recirculació.

Altres paràmetres determinats en aquest experiment van ser: sòlids en suspensió (SST), terbolesa (FAU), clor i brom lliure (mg/l). En la taula 10 es mostren els resultats obtinguts dels dos mòduls.

Taula 10: Evolució dels paràmetres sòlids en suspensió (SST), terbolesa, clor i brom lliure (mg/l) en els dos mòduls de tractament d'aigües.

Dia cultiu	Sense ozó					Amb ozó			
	Nivells ozó	SST	Terbolesa	Cl lliure	Br lliure	SST	Terbolesa	Cl lliure	Br lliure
1	0	49	0	0,00	0,12	37	0	0,02	0,00
3	1	37	1	0,00	0,05	9	0	0,00	0,10
5	2	5	8	0,02	0,00	53	8	0,09	0,15
8	3	6	0	0,13	0,09	28	0	0,03	0,44
10	4	5	6	0,06	0,13	40	3	0,08	0,21
12	5	20	0	0,00	0,06	14	4	0,04	0,07
17	6	21	2	0,06	0,09	66	0	0,10	0,14
19	0	20	0	0,14	0,20	22	0	0,03	0,11
22	0	19	0	0,06	0,30	33	2	0,15	0,72
24	0	135	2	0,07	0,08	95	7	0,05	0,07

En aquest cas tampoc no es veu una tendència clara en cap dels paràmetres valorats. Com ja s'ha comentat anteriorment en l'apartat 4.1.2., és possible que el colorímetre Hach no fos l'aparell adequat per a mesurar aquests paràmetres.

Fent referència al potencial redox se'n van prendre mesures diàries (Taula 11). La taula següent, mostra el nivell d'ozó aplicat a l'aigua de cultiu. Es pot veure, que es repeteix la situació de l'experiment anterior (veure apartat 4.1.2.), ja que el potencial redox del mòdul control i el d'injecció d'ozó evolucionen paral·lelament.

Taula 11: Evolució del potencial redox (mV) en els sistemes de cultiu.

Dia cultiu	Nivells ozó	Sense ozó	Amb ozó
1	0	115,0	102,1
2	0	92,0	98,0
3	1	87,0	93,0
4	1	68,3	68,3
5	2	46,4	48,4
8	3	84,7	83,4
9	3	41,0	41,4
10	4	62,2	55,0
11	4	113,1	90,1
12	5	58,7	55,9
17	6	194,5	224,9
18	6	-7,6	1,3
19	0	2,0	-2,6
22	0	9,7	3,6
23	0	34,1	20,5
24	0	-2,7	-5,8
25	0	5,1	-4,4

Els resultats referents a la **càrrega bacteriana** present en l'aigua de cultiu es mostren a la taula 12, en unitats formadores de colònies per ml (UFC/ml) en el mòdul control i en el mòdul d'injecció d'ozó. Acabat l'experiment es van seguir sembrant mostres pel període de recuperació abans esmentat.

Taula 12: Evolució de la càrrega microbiana (UFC/ml) en els tancs de cultiu d'ambdós mòduls.

Dia cultiu	Nivells ozó	Sense ozó	Amb ozó
2	0	4,53E+04	1,28E+05
4	1	2,63E+04	5,47E+04
9	3	1,48E+04	2,00E+05
11	4	1,79E+04	1,34E+05
18	6	4,04E+05*	1,35E+05
23	0	1,49E+05	5,37E+05

*Valor indicatiu

No existeixen diferències significatives (U-Mann-Whitney, N=6, graus de llibertat=5, T=30, P = 0,180) en la càrrega bacteriana present en l'aigua de cultiu amb o sense ozonització.

Els gràfics següents (Figura 18) mostren la **mortalitat** durant i després l'experiment (el període de recuperació).

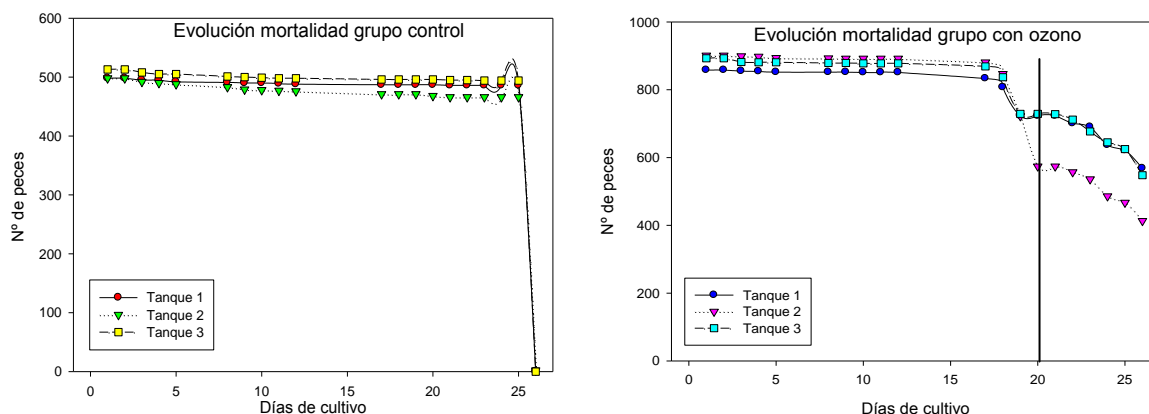


Figura 18: Evolució de la mortalitat en el mòdul control (esquerra) i en el mòdul d'injecció d'ozó (dreta). La línia en el dia 20 marca la finalització de l'experiment amb el període de recuperació posterior.

La mortalitat habitual durant l'experiment era d'un o dos individus per tanc diaris en els dos mòduls. El dia 19 de cultiu, amb un nivell 6 de dosificació d'ozó, va ser el primer dia que hi va haver una diferència del 10% de mortalitat entre els mòduls. El dia 20, va augmentar un 10% més la mortalitat en el mòdul d'injecció d'ozó, quedant un 75% dels peixos.

Aquesta elevada mortalitat en tan pocs dies va portar a decidir de parar la generació d'ozó i mantenir-los uns dies sense ozó a fi de recuperar-se; les baixes van disminuir.

La conseqüència directa de la mortalitat seria l'elevada concentració en amonis, nitrats i nitrats (veure figura 16), ja que són dades coincidents en el temps (dia 20 de cultiu).

L'últim dia es va realitzar el tractament d'H₂O₂ (l'ús de peròxid d'hidrogen com agent profilàctic és molt usual en aqüicultura marina), això va provocar la mortalitat de gairebé tots els alevins de reig del mòdul control i la meitat de baixes del mòdul d'injecció d'ozó. Es creu que els peixos estaven en mal estat i per això va haver-hi una mortalitat de gairebé tots els individus en els dos mòduls.

La **natació** dels peixos en el mòdul control era normal (nedant tots en el mateix sentit i amb la mateixa velocitat en el tanc de cultiu), però en el mòdul d'injecció d'ozó es va observar un canvi a partir del nivell 5 de dosificació d'ozó, de manera que es va observar que els peixos nedaven amb el cos invertit per la superfície morint posteriorment. Per això, es va decidir parar la generació d'ozó, encara que la reducció dels nivells d'ozó en l'aigua van induir una estabilització en els nivells de mortalitat. Alguns peixos van romandre encara en la part inferior del tanc sense nedar, indicant una situació d'estrès (Castelló, 1993).

El **comportament** en el mòdul d'injecció d'ozó, com en el cas de les orades de l'experiment anterior, era lleugerament diferent al del mòdul control. A mida que s'augmentava la dosi d'ozó en l'aigua, els peixos estaven més actius, més nerviosos i aparentment més famolencs. Quan es va arribar al nivell 5, dia 12 de cultiu, la ingestió d'aliment va disminuir i es va observar la natació invertida indicada anteriorment.

Anomalies: Un cop acabat l'experiment, en el període de recuperació, es va observar que els reigs del mòdul d'injecció d'ozó patien *Linfocistis*, una infecció vírica (un herpesvirus) que, encara que els juvenils poden patir-ho de forma crònica, no es manifesta fins que els peixos es troben en situacions d'estrès provocant una baixa resposta immunològica. Per aquest motiu es va decidir fer un tractament amb aigua oxigenada a 300 ppm que va provocar la mort pràcticament de tots els peixos del grup control i una part dels sotmesos a ozonització.

4.3. Experiment 3/Juvenils d'orada

L'objectiu d'aquest experiment era avaluar l'efecte de l'ozó sobre juvenils d'orada de 54 g de pes viu mig (comportament, alimentació, mortalitat i/o aparició de malalties) i sobre la flora bacteriana present en l'aigua dels tancs de cultiu.

Amb l'experiència dels assajos anteriors, els nivells d'ozó van ser augmentats més lentament, ja que alts nivells d'ozó en l'aigua afecta sèriament al metabolisme dels peixos. L'alimentació va ser racionada per un millor control dels peixos.

4.3.1. Material i mètodes

Cultiu experimental

Es van utilitzar juvenils d'orada de 53,63 g de pes viu mig provinents de l'IRTA. En el mòdul control hi havia una biomassa de 4,26 kg, i en l'altre mòdul una biomassa de 4,25 kg, amb el que en els dos casos hi havia una biomassa de 2,84 kg/m³ en un tanc de cada mòdul (una densitat de 80 peixos per tanc).

Disseny experimental i condicions de cultiu

El generador d'ozó utilitzat era l'Erwin Sander S1000 mg. Es van marcar sis nivells diferents de generació d'ozó, de 0 a 1000 mg/h, pel que cada augment de dosi era d'uns 166 mg/h aproximadament. El cabal d'aire d'entrada era de 10 l/h (veure Taula 3).

L'experiment va durar sis setmanes, cada setmana s'augmentava un nivell la dosi d'ozó a fi de veure més clarament si l'ozó afectava a les orades i quins efectes provocava. Es va donar un 2% d'alimentació al dia amb un pinso de creixement estàndard (Skretting) de mida D2 i D4.

En el mòdul control i en el d'injecció d'ozó el cabal era de 64 l/h i la temperatura era de 24°C (temperatura en que l'animal està fisiològicament parlant més actiu). Es tenia un registre de dades en continu del nivells d'oxigen dissolt en l'aigua, la temperatura i el cabal en els dos mòduls.

Controls

A l'inici de l'experiment es van pesar els peixos obtenint un pes mig per a cada mòdul i sabent el nombre de peixos que hi havia per tanc i, per tant, la seva biomassa. S'observaven a diari per a comprovar que el comportament i la natació fossin els normals. Durant l'experiment es va dur un control de la mortalitat en els tancs de cultiu.

Es controlaven els paràmetres físico-químics de l'aigua (pH, salinitat, temperatura, oxigen i potencial redox) a diari amb la sonda YSI per a portar un control. Tres cops per setmana es mesuraven els següents paràmetres amb el colorímetre Hach: amoníac, nitrats, nitrògens, terbolesa, sòlids en suspensió, clor i brom lliure. Pel control microbiològic de l'aigua de cultiu, dos vegades a la setmana es realitzaven sembres en medi *Marine agar*, fent 24 hores més tard el recompte del nombre de colònies de les plaques.

4.3.2. Resultats i discussió

Al llarg de l'experiment, amb una duració de 51 dies de cultiu, es va dur un seguiment dels **paràmetres físico-químics** de l'aigua (Taula 13.1 i Taula 13.2). La taula mostra el nivell d'ozó aplicat en l'aigua de cultiu.

Taula 13.1: Paràmetres físico-químics de l'aigua de cultiu en el mòdul control.

Dia cultiu	Nivell ozó	pH	O ₂ (mg/l)	Sal ‰	T (°C)
1	0	7,75	5,55	34,5	22,74
3	0	7,67	4,48	34,18	22,04
6	0	7,72	4,70	34,42	22,40
7	0	7,69	4,30	34,57	25,70
10	0	7,65	4,97	34,58	22,06
28	0	7,59	4,70	35,44	21,90
29	0	7,52	4,21	35,37	22,39
30	0	7,57	4,77	35,43	22,62
31	0	7,61	4,32	35,52	22,05
35	0	7,42	4,28	35,49	22,29
36	0	7,41	3,98	35,51	22,50
37	0	7,40	4,63	35,56	22,59
42	0	7,51	4,92	35,68	21,68
43	0	7,32	5,13	35,78	22,53
44	0	7,33	5,05	35,83	22,57
45	0	7,37	4,98	35,95	22,65
49	0	7,14	5,13	36,28	22,55
50	0	7,18	4,95	36,40	22,57
51	0	7,08	4,48	36,49	22,61
52	0	7,09	5,08	36,64	22,58

Taula 13.2: Paràmetres físico-químics de l'aigua de cultiu en el mòdul d'injecció d'ozó.

Dia cultiu	Nivell ozó	pH	O ₂ (mg/l)	Sal ‰	T (°C)
1	0	7,83	5,49	34,45	23,15
3	0	7,72	5,46	33,20	23,60
6	0	7,76	4,76	33,52	23,09
7	1	7,72	4,84	33,65	22,30
10	1	7,70	6,29	33,99	21,96
28	2	7,52	7,25	35,27	22,15
29	2	7,50	5,73	35,26	21,84
30	2	7,54	6,25	35,33	21,95
31	2	7,56	6,31	35,39	21,95
35	3	7,42	6,86	35,77	22,00
36	3	7,41	7,75	35,65	21,97
37	3	7,38	6,45	35,68	22,04
42	4	7,42	6,70	35,97	22,01
43	4	7,30	7,42	36,05	21,96
44	4	7,30	6,51	36,09	21,97
45	4	7,31	6,62	36,06	22,08
49	5	7,07	6,17	36,17	22,02
50	5	7,05	7,79	36,23	21,93
51	5	6,96	6,60	36,29	21,94
52	5	7,01	5,93	36,4	21,84

Els paràmetres físico-químics es comporten de la mateixa manera que en els experiments anteriors (veure apartat 4.1.2.), amb la diferència que el pH inicial en els dos mòduls és de 7,8 i baixa progressivament fins a 7 degut al desequilibri de carbonats-bicarbonats en l'aigua.

Es va determinar la quantitat de nitrogen dissolt en l'aigua en forma d'amonis, nitrats i nitrats (Figura 19) en els dos mòduls.

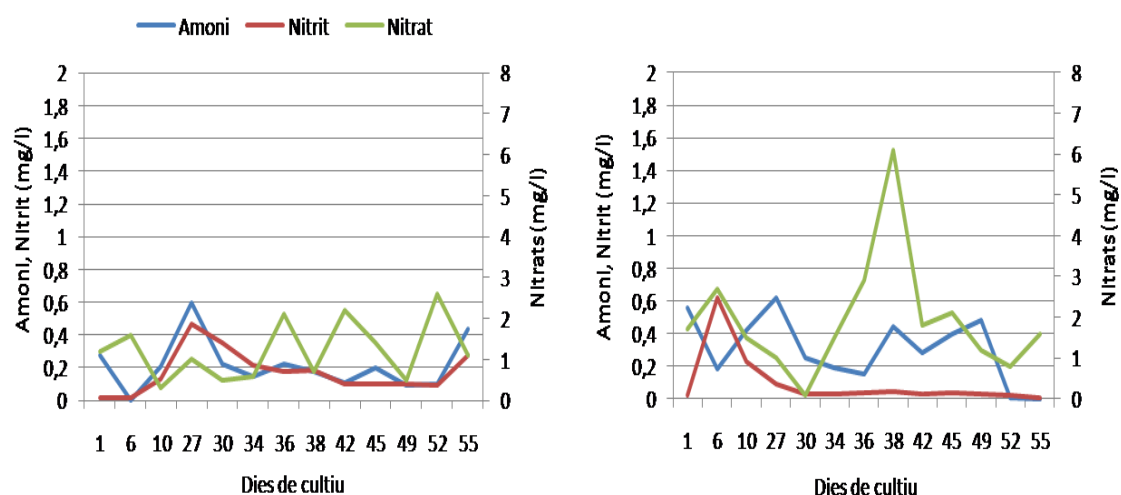


Figura 19: Evolució del nitrogen dissolt en l'aigua en forma d'amonis, nitrats i nitrats en mg/l, en el mòdul control (esquerra) i en el mòdul d'injecció d'ozó (dreta).

Els gràfics mostren irregularitats en l'evolució dels amonis, nitrits i nitrats, el que indica que els biofiltres estaven descarregats de bacteris nitrificants. Aquest experiment té unes concentracions molt més baixes d'amonis, nitrits i nitrats a diferència dels dos anteriors, ja que disposava d'una biomassa inferior.

Els nivells d'amonis són baixos i estables. A l'inici de l'experiment podrien haver-hi hagut problemes de toxicitat (Chen et al., 1995; Losordo, 2004), ja que el pH era elevat (de 7,8) però les concentracions d'amoni durant l'experiment van ser molt baixes com per a patir-ne les conseqüències. Pel que fa el nitrit, té un augment brusc en els dos casos a l'inici de l'experiment, però amb el temps és absorbit pels bacteris nitrificants. En el cas de l'ozó aquest procés és ràpid, possiblement degut a l'efecte de l'ozó (Phillip et al., 2004), amb un conseqüent augment dels nitrats.

Altres paràmetres determinats en aquest experiment van ser: sòlids en suspensió (SST), terbolesa (FAU), clor i brom lliure (mg/l). En la taula 14 es mostren els resultats obtinguts dels dos mòduls.

Taula 14: Evolució dels paràmetres sòlids en suspensió (SST), terbolesa, clor i brom lliure (mg/l) en els dos mòduls de tractament d'aigües.

Dia cultiu	Sense ozó					Amb ozó			
	Nivell ozó	SST	Terbolesa	Cl lliure	Br lliure	SST	Terbolesa	Cl lliure	Br lliure
1	0	118	3	-	-	82	1	-	-
6	0	53	0	0,00	0,14	44	0	0,07	0,16
10	1	56	0	-	-	58	6	-	-
27	1	20	4	0,00	0,09	52	0	0,05	0,04
30	2	35	8	-	-	31	0	-	-
34	2	16	2	0,07	0,02	29	0	0,09	0,00
36	3	5	9	-	-	23	0	-	-
38	3	26	1	0,24	0,08	36	1	0,11	0,51
42	4	30	10	-	-	20	0	-	-
45	4	96	7	0,24	0,00	32	0	0,04	0,16
49	5	38	7	-	-	36	5	-	-
52	5	20	12	0,00	0,09	6	3	0,15	0,20
55	5	107	0	0,00	0,51	74	0	1,21	2,79

Com ja s'ha comentat anteriorment, és de destacar que, encara que els resultats de mesura de terbolesa i sòlids en suspensió mitjançant el colorímetre Hach no semblaven indicar diferències en aquests paràmetres entre els tancs amb i sense ozó, a simple vista (Figura 20) era molt notori l'efecte de l'ozó sobre les partícules en suspensió, fent que l'aigua de cultiu fos més transparent que quan no s'aplicava ozó.



Figura 20: Evident diferència entre els tancs de cultiu tractats amb ozó (esquerra) i els no tractats (dreta) al dia 29 de cultiu en recirculació. Font: Mòdul de tractament d'aigües v.1.2., IRTA de Sant Carles de la Ràpita.

Fent referència al potencial redox se'n van prendre mesures diàries (Taula 15). Com s'ha comentat anteriorment (veure apartat 4.1.2.), la taula mostra el nivell d'ozó aplicat a l'aigua de cultiu. La situació es repeteix en aquest tercer experiment.

Taula 15: Evolució del potencial redox (mV) en els sistemes de cultiu.

Dia cultiu	Nivell ozó	Sense ozó	Amb ozó
1	0	224,1	242,7
3	0	209,3	202,3
6	1	162,9	158,8
7	1	146,3	148,8
10	1	149,3	152,4
28	2	-20,1	-12,3
29	2	-11,9	-3,2
30	2	1,2	15,0
31	2	21,0	27,0
35	3	-16,6	-5,4
36	3	29,6	82,1
37	3	12,2	30,5
42	4	-19,3	-6,7
43	4	-17,4	-9,6
44	4	-18,6	-10,5
45	4	-21,5	-9,1
49	5	21,7	38,8
50	5	10,1	22,5
51	5	46,3	196,6
52	5	6,1	43,0

Els resultats referents a la **càrrega bacteriana** present en l'aigua de cultiu es mostren a la figura 21, en unitats formadores de colònies per ml (UFC/ml) en el mòdul control i en el mòdul d'injecció d'ozó.

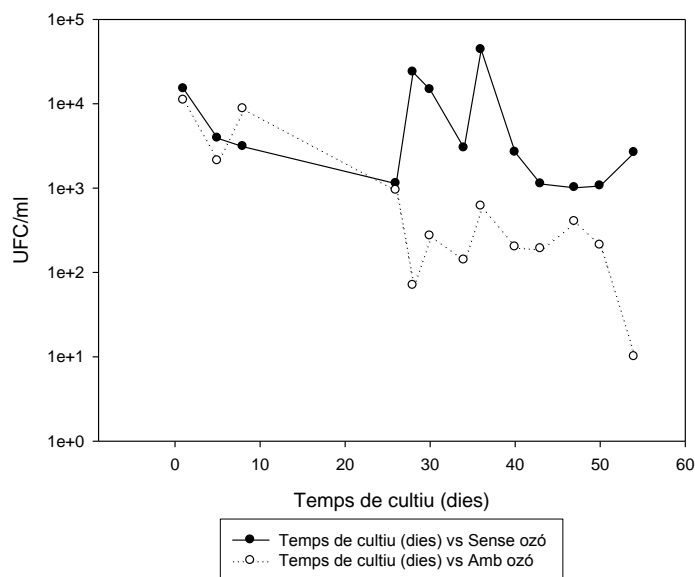


Figura 21: Evolució de la càrrega microbiana (UFC/ml) en els tancs de cultiu d'ambdós mòduls.

En aquest cas i, a diferència dels experiments anteriors –possiblement degut a la menor càrrega de peixos en els tancs– sí es van observar diferències significatives amb les dades normalitzades (*t* de Student, $N=13$, graus de llibertat=12, $t=3,592$, $P = 0,001$), essent la càrrega bacteriana present en l'aigua ozonitzada clarament inferior a la dels tancs de control. Les dades de l'experiment es van normalitzar únicament en aquest cas degut a la restricció de cada mètode ja que podrien donar resultats diferents.

L'experiment s'inicia amb una càrrega bacteriana de 10^4 UFC/ml en els dos mòduls amb una evolució similar fins el dia 26 de cultiu, a partir del qual tenen creixements diferents. El dia 28 el mòdul d'injecció d'ozó baixa 2 ordres de magnitud respecte el punt inicial, ja que la dosificació s'augmenta al nivell 2, en canvi el mòdul control augmenta la seva càrrega bacteriana. A partir del dia 30 s'observa una evolució semblant i paral·lela, però l'ozó amb una càrrega inferior a la del mòdul control.

La **mortalitat** en el mòdul control va ser nul·la. En el mòdul d'injecció d'ozó va començar el dia 26 de cultiu amb un nivell 1 de dosificació d'ozó; molt aviat, considerant que es va acabar el dia 54 amb el 100% de la població (Figura 22). Del dia 26 fins al 46 van haver-hi baixes de manera puntual en el mòdul de l'ozó. En quatre dies, va haver-hi un 10% de baixes, quedant un 80 % de supervivència del cultiu d'orades. El dia

51, es va morir casi la totalitat dels individus en el mòdul d'injecció d'ozó, a diferència del mòdul control, que no va haver-hi cap baixa durant tot l'experiment.

Dia cultiu	Nivell ozó	Sense ozó	Amb ozó
1	1	80	79
28	1	80	77
34	2	80	76
42	3	80	76
48	4	80	75
52	5	80	64
53	5	80	6
54	5	80	0

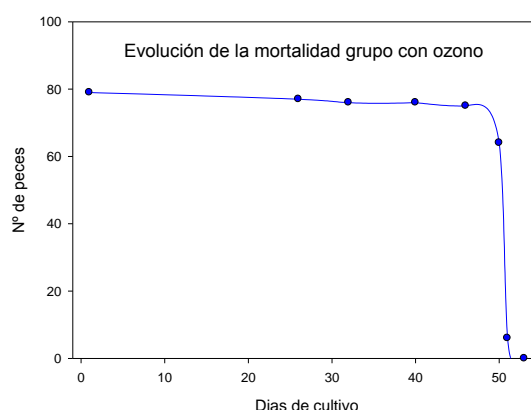


Figura 22: Evolució de la mortalitat a ambdós mòduls en nombre d'individus (esquerra) i evolució de la mortalitat en el mòdul d'injecció d'ozó (dreta).

Tot seguit, es comenten els factors que afecten directament als peixos utilitzats en l'experiment.

El **comportament** dels peixos en el mòdul d'injecció d'ozó era lleugerament diferent al del mòdul control. A partir del nivell 3 els peixos del mòdul de l'ozó es van enfosquir més que els control, indicant un principi de situació d'estrès (Castelló, 1993). A partir del nivell 5 de dosificació d'ozó es va observar una certa inactivitat. La ingestió d'aliment va disminuir.

La **natació** dels peixos en els dos mòduls era normal, nedant tots en el mateix sentit i amb la mateixa velocitat en el tanc de cultiu. A partir del nivell 5 de dosificació d'ozó es va observar un canvi (Figura 23) en el mòdul de l'ozó, veient que els peixos tenien tendència a nedar en sentits i direccions diferents.



Figura 23: La natació dels peixos el dia 50 de cultiu en el mòdul d'injecció d'ozó al nivell 5 de dosificació d'ozó. Font: Mòdul de tractament d'aigües v.1.2., IRTA de Sant Carles de la Ràpita.

Anomalies: Es va observar que en el grup tractat amb ozó en el nivell 2 de dosificació d'ozó, l'epidermis dels peixos es començava a degradar amb el temps d'aplicació, quedant el múscul al descobert, el que va provocar molt probablement l'atac de bacteris oportunistes (Bullock et al., 1997) presents en l'aigua provocant la mortalitat total de l'estoc de peixos.

Donat que la toxicitat de l'ozó és la combinada per concentració d'ozó (C) i temps d'exposició (T), es podria dir que l'efecte observat en aquest experiment genera més toxicitat una major T i una menor C (Coman et al., 2005; Ben-Atia et al., 2007), pel fet que els peixos van passar-se 20 dies amb el nivell 1 de dosificació d'ozó.

Els tractaments d'ozó, per tant, consisteixen en una sèrie de temps de contacte (CT) utilitzats per a determinar la concentració desinfectant i la CT necessària per a inactivar els microorganismes (Ben-Atia et al., 2007). Els valors CT es calculen multiplicant la dosi d'ozó aplicada en un temps d'exposició determinat, pel que el pròxim experiment es podria dissenyar amb una major C i una menor T per a veure l'efectivitat de l'ozó. Per tant, es podria dir que l'efectivitat de l'ozó com agent oxidant està en funció de la dosi aplicada i el temps de contacte (Lawson i Merry, 1991; Coman et al., 2005).

4.4. Discussió general

No s'han trobat diferències en els paràmetres físico-químics de l'aigua en cap dels tres experiments.

Els amonis, nitrits i nitrats segueixen una evolució similar, però tenen una diferència clara en quant a les concentracions. L'experiment 3, degut a la seva biomassa, té unes concentracions molt inferiors que no superen els 8 ppm en cap dels tres paràmetres. A més a més, a diferència dels altres dos experiments, parteix d'un biofiltre molt poc carregat en bacteris nitrificants, el que dóna irregularitats en l'evolució del nitrogen dissolt. En canvi, l'experiment 2 arriba a uns nivells de fins a 800-850 ppm de nitrits i nitrats, degut a l'elevada mortalitat en el mòdul d'injecció d'ozó.

Si es compara el mòdul control amb el mòdul d'injecció d'ozó, s'observa una diferència de nivell de nitrats en el mòdul de l'ozó, essent aquest superior que al del mòdul control, degut a la major i més ràpida descomposició dels compostos nitrogenats presents en l'aigua. Amb l'ozó, l'amoníac passa més ràpidament a nitrits i aquests, en nitrats, forma que generalment serveix d'acumulació i que no representa cap toxicitat per als organismes marins. La reducció brusca dels nitrits en l'experiment 3 pot ser deguda a l'ozó, ja que aquest accelera el procés de nitrificació (Phillip et al., 2004).

No hi ha diferències significatives en cap dels tres experiments en els paràmetres de sòlids en suspensió, terbolesa, clor i brom lliure, ja que no hi ha una tendència clara de cap d'ells. Probablement l'ozó subministrat en l'aigua marina reacciona molt ràpidament amb les partícules en suspensió i les sals dissoltes sense produir cap canvi que es pugui mesurar amb els sistemes i equips disponibles, ni el potencial redox de l'aigua, ni en els nivells de brom i clor alliberats.

En el cas dels sòlids en suspensió i la terbolesa, encara que s'observava clarament l'efecte de l'ozó en la reducció d'aquests paràmetres (visualment es veien els tancs tractats amb ozó amb una aigua més neta i transparent), els sistemes de mesura colorimètrica no van ser el suficientment precisos per a detectar canvis.

Pel que fa al potencial redox no es van detectar diferències en aquest paràmetre en cap dels tres casos, ja que en els dos mòduls el potencial evoluciona de manera paral·lela durant tot l'experiment. Això pot ser degut a que la sonda de potencial redox amb elèctrode de platí no era lo suficientment ràpida ni precisa per a detectar els canvis (es recomanen sondes d'or). Per això, en les últimes proves realitzades en aquest treball es va optar per a incloure un generador nou més potent i

precís a la hora de generar els potencials redox i amb sondes d'elèctrode d'or.

La microbiologia de l'aigua sí dona resultats significatius en l'experiment 3, amb una reducció de dos ordres de magnitud. En l'experiment 1 hi ha una reducció d'un ordre de magnitud. I en l'experiment 2 no hi ha diferències, probablement perquè les dosis d'ozó subministrades no eren el suficientment grans com per a induir la desinfecció de l'aigua. De qualsevol manera, un subministrament elevat d'ozó (nivells 5 i 6) provocaven greus problemes en els peixos, pel que no resulta fàcil conjugar unes condicions d'higiene de l'aigua (reducció de colònies bacterianes) i seguretat dels peixos (mortalitat, comportament normal i creixement).

En alguns casos, es va assolir un nivell d'ozó que influïa negativament sobre el cultiu experimental. En l'experiment 2 el nivell d'ozó en que va haver-hi mortalitat va ser el nivell 4 de dosificació d'ozó (0,664 mg/h), en el qual els peixos deixaven de tenir un comportament i natació normal. En l'experiment 3 es va arribar fins el nivell 6 de dosificació d'ozó sense excessives baixes. En quedar afectat el seu sistema immunològic, els peixos queden exposats a possibles atacs de bacteris oportunistes. Això provoca un nombre molt important de baixes en el cultiu tractat amb ozó al cap dels dies.

Després de les experiències realitzades, s'ha vist que es podrien modificar alguns aspectes per a millorar la valoració dels paràmetres desitjats. Per exemple, disposar d'un generador d'ozó que s'autoreguli per a aconseguir un potencial redox estable en el temps, tenint en compte la demanda d'ozó que hi pugui haver. Així com disposar d'una sonda de potencial redox amb elèctrode d'or per a que les lectures siguin ràpides i fiables.

Es proposa que per un futur experiment es realitzin frotis segons Bullock et al. (1997) de les brànquies dels peixos que hagin mort, ja que la bibliografia cita exemples de destrucció de l'epiteli de les brànquies a causa de l'ozó deixant al descobert la brànquia, susceptible de patir qualsevol infecció bacteriana (Summerfelt, 2003).

Es proposa també realitzar un experiment de llarga durada en que les dosificacions d'ozó es realitzin amb un temps d'exposició sempre constant, de manera que els dies de cultiu finals siguin els mateixos i, així, poder veure diferències i efectivitat de l'ozó sobre els peixos i l'aigua de cultiu.

5. CAPÍTOL II: Experimentació amb rotífer

El rotífer marí *Brachionus plicatilis* és un excel·lent primer aliment per les larves de peix i crustacis (Figura 24) de 300-350 µm (Estévez, 2000). És un cultiu inestable (amb un màxim rendiment als quatre dies) possiblement per la degradació gradual de l'aigua que indubtablement afecta a la qualitat del rotífer i, per tant, també a l'origen de la variabilitat de la producció de larves (Suantika et al., 2001).

Es va demostrar (Suantika et al., 2003) que la qualitat de l'aigua és un prerrequisit a tenir en compte pel cultiu de rotífer, ja que aquests són portadors de bacteris causant una baixa taxa de supervivència i poc creixement en larves (Giménez et al., 2006; Battaglione i Morehead, 2006). Per aquesta raó, es vol investigar les avantatges de l'ozó en la qualitat de l'aigua com a desinfectant i el cultiu de rotífer (Suantika et al., 2001).

El primer assaig es va fer encarant al cultiu del rotífer *Brachionus plicatilis*. La finalitat era saber quin seria el potencial redox òptim per a que la població de rotífers es mantingués estable o millorés degut a la qualitat de l'aigua, sense afectar a la producció d'ous (Suantika et al., 2001).

L'altre assaig, realitzat amb la mateixa espècie, té una finalitat diferent a l'anterior, ja que enlloc d'avaluar l'efecte de l'ozó sobre el creixement de la població de rotífer es va estudiar com desinfectar el rotífer collit mitjançant l'ús de l'ozó i abans de distribuir-lo a les larves de peix, molt sensibles a la flora bacteriana que aporta l'aliment viu (Giménez et al., 2006; Battaglione i Morehead, 2006).

Els dos últims assajos va ser una combinació dels dos anteriors procedint al cultiu de rotífer i realitzant les anàlisis pertinents per a la desinfecció del mateix i de l'aigua de cultiu.

S'ha de tenir en compte que el cultiu de rotífer és diferent del cultiu de peixos marins, pel que les seves condicions de cultiu idònies són unes altres. El cultiu de *Brachionus plicatilis* ofereix uns rangs amplis tant de salinitat com de temperatura. Es consideren uns marges de treball de salinitat en l'aigua de 18-25 ppt, o fins i tot en aigua salada normal de 32-35 ppt, en funció de l'aliment subministrat. Malgrat tot, el rotífer utilitzat no selecciona el seu aliment (espècie polífaga), podent alimentar-se de microalgues, bacteris o llevat. La temperatura òptima del cultiu és d'entre 22-27°C (Estévez, 2000; www.cenaim.espol.edu.ec/publicaciones/artemia/cartillas/34-36.pdf, 15-09-09).

Pel que fa la reproducció, s'ha de saber que és partenogenètic, és a dir, que no intervenen cèl·lules masculines per a la producció d'ous. Això vol dir, que només en condicions de cultiu òptimes, el rotífer produirà ous.

El percentatge de femelles ovades és un bon indicador de l'estat de la població. Si el percentatge és inferior al 10%, indica que la població no s'està mantenint adequadament, bé per falta d'aliment, bé perquè les condicions de l'aigua del cultiu no són les idònies; en canvi, si el percentatge és superior al 10%, vol dir que la població es manté o que augmenta en el nombre d'individus.



Figura 24: Rotífer *Brachionus plicatilis* amb dos ous. Font: SINTEF Marine Aquaculture, per J. B. Leonardsen.

5.1. Experiment 4/Cultiu de rotífer

L'objectiu d'aquest experiment era valorar l'efecte de l'ozó sobre el creixement de la població del rotífer (mortalitat, mobilitat i percentatge de femelles ovades) i sobre la flora bacteriana present en l'aigua dels tancs de cultiu.

Generalment el rotífer es cultiva en tancs d'entre 100 i 1000 litres de capacitat, però aquest experiment es va realitzar en volums petits (cistelles de malla) distribuïts en el tanc d'aplicació d'ozó per a poder treballar en recirculació.

Donat el disseny experimental i l'efecte que causa l'ozó sobre el fitoplàncton (Kureshi et al., 1999), es va decidir alimentar el rotífer amb un producte comercial en comptes de fer-ho amb microalgues.

5.1.1. Material i mètodes

Cultiu experimental

Els recipients utilitzats pel cultiu del rotífer eren cistelles de malla previstes de flotadors (Figura 25) en les que la malla tenia un porus de 50 μm , mida que evita que s'escapi el rotífer. Cada cistella tenia una capacitat volumètrica de 8 litres, i es disposava en duplicat o triplicat en un tanc de 1,5 m³. L'inòcul inicial era de 500 individus/ml, això vol dir 4×10^6 rotífers per cistella.

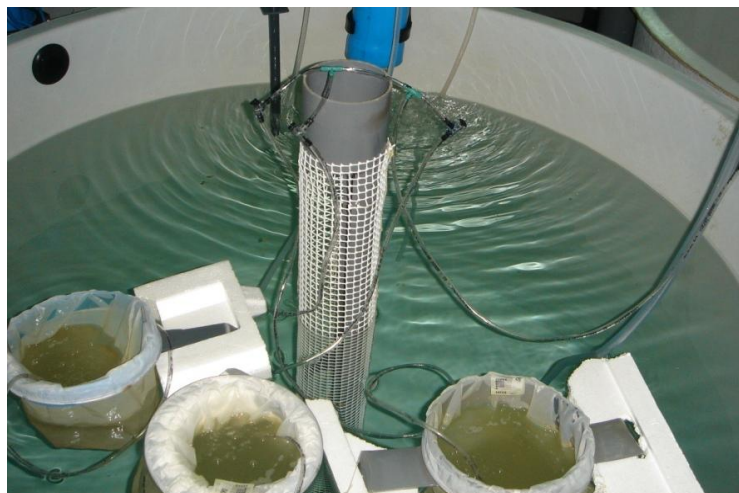


Figura 25: Cistelles de malles flotants en el tanc de cultiu del mòdul v.1.2. de l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita. Font: Mòdul de tractament d'aigües v.1.2., IRTA de Sant Carles de la Ràpita.

Disseny experimental i condicions de cultiu

El generador d'ozó utilitzat era l'Erwin Sander S1000 mg. Es van marcar dos nivells de generació d'ozó, nivell en que no es generava ozó i el nivell màxim de 1000 mg/h. El cabal d'aire d'entrada durant tot l'experiment era de 10 l/h.

L'experiment va durar una setmana. Els tres primers dies no es generava ozó, i els quatre dies restants el generador treballava al nivell màxim. L'aliment subministrat es basava en preparar *Culture Selco plus* (subministrat per INVE Aquaculture) d'acord amb les instruccions del fabricant.

En el mòdul control i en el d'injecció d'ozó el cabal era de 32 l/h i la temperatura era de 24°C. Es tenia un registre de dades en continu del nivells d'oxigen dissolt en l'aigua, la temperatura i el cabal en els dos mòduls.

Aquesta prova es va repetir tres vegades, però amb petites modificacions:

- El primer cop, es van col·locar quatre cistelles, dos al mòdul control i dos al mòdul de l'ozó (*Repetició 1*).
- La vegada següent es disposava de sis cistelles, tres control i tres pel mòdul de l'ozó. A fi de no crear-se un microclima dins de la cistella (degut a l'alimentació i al micratge de la pròpia malla), arribant així l'aigua ozonitzada dins la cistella, es va optar per a una renovació directa de l'aigua del tanc dins la cistella mitjançant tubs de petit diàmetre (*Repetició 2*).
- La tercera vegada es disposava de sis cistelles, tres control i tres pel mòdul de l'ozó. La seva distribució en el tanc es va canviar, ficant les cistelles amb renovació directe però més lluny de l'entrada de l'aigua per a no crear turbulències (*Repetició 3*).

Controls

Es controlaven els paràmetres físico-químics de l'aigua (pH, oxigen, salinitat, temperatura, i potencial redox) a diari amb la sonda YSI per a portar un control. Durant l'experiment es van mesurar dos vegades els següents paràmetres amb el colorímetre Hach: amoníac, nitrats, nitrògens, terbolesa, sòlids en suspensió, clor i brom lliure.

Pel control microbiològic de l'aigua de cultiu, es van realitzar tres sèries en agar marí, incubant a 28°C i fent 24 hores més tard el recompte del nombre de colònies de les plaques (Suantika et al., 2001; Suantika et al., 2003).

A diari, es duia a terme un recompte del nombre de rotífers i rotífers ovats presents en cada malla amb una mostra representativa d'1 ml a la lupa amb una gota de lugol, aquest tenyeix els organismes de color morat fent més fàcil el recompte poblacional (Suantika et al., 2001; Suantika et al., 2003). Cada dia es repetia aquesta tasca per a avaluar l'evolució de la població i, així, subministrar l'aliment adequat per a cada malla. La mobilitat era l'observació d'una mostra representativa d'1 ml sense lugol cada vegada que es realitzava el recompte amb l'ajuda d'una placa petri reticulada, i la mostra prèviament homogeneïtzada.

5.1.2. Resultats i discussió

Al llarg de l'experiment, amb una duració de 7 dies de cultiu, es va dur un seguiment dels **paràmetres físico-químics** de l'aigua (Taula 16.1 i 16.2). La taula mostra el nivell d'ozó aplicat en l'aigua de cultiu. Els tres grups de valors de les taules corresponen a les tres repeticions que es van realitzar en aquest experiment.

Taula 16.1: Paràmetres físico-químics de l'aigua de cultiu en el mòdul control.

Dia cultiu	Nivells ozó	pH	O ₂ (mg/l)	Sal (‰)	T (°C)
1	0	8,12	5,49	29,34	23,64
5	0	8,13	5,15	29,51	23,10
6	0	8,16	5,40	29,55	23,84
7	0	8,10	5,35	29,53	24,00
3	0	8,11	6,32	29,70	23,79
5	0	8,11	7,29	29,82	23,63
6	0	8,14	6,08	29,92	23,50
3	0	8,08	6,73	28,99	23,60
5	0	8,12	6,89	28,58	23,01
6	0	8,08	5,73	28,69	23,40
7	0	8,14	5,49	28,68	23,01

Taula 16.2: Paràmetres físico-químics de l'aigua de cultiu en el mòdul d'injecció d'ozó.

Dia cultiu	Nivells ozó	pH	O ₂ (mg/l)	Sal (‰)	T (°C)
1	0	8,09	4,85	30,55	23,82
5	6	8,18	7,46	30,01	23,17
6	6	8,21	19,72	29,92	23,44
7	6	8,17	6,33	30,03	23,12
3	0	8,11	7,18	30,07	23,49
5	6	8,11	11,94	30,30	23,85
6	6	8,04	10,72	30,24	23,11
3	0	8,09	11,41	28,11	23,66
5	6	8,13	11,63	27,46	23,12
6	6	8,19	9,20	27,55	23,19
7	6	8,21	8,87	27,62	23,26

En els dos mòduls es manté un pH estable entre 8,1 i 8,2 (Suantika et al., 2001; Suantika et al., 2003). Com ja s'ha comentat anteriorment, l'experiència ens diu que a l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita la recirculació acidifica el medi, ja que agents externs com l'alimentació poden afectar en els equilibris de les sals dissoltes de l'aigua de mar, però degut a que cada experiment durava només 7 dies, no donava temps a que repercutís en el pH.

La concentració d'oxigen dissolt va ser en les tres repeticions inferior en el mòdul control que en el mòdul d'injecció d'ozó. En el mòdul control és baix probablement degut a la temperatura més que a la càrrega mantinguda en els tancs (Henry i González, 2008). En el mòdul d'injecció d'ozó la concentració d'oxigen és fins a un 60-70 % més elevada respecte el punt inicial per la presència d'ozó. Aquest reacciona amb altres sals dissoltes en l'aigua i es transforma en oxigen, afavorint així les condicions ambientals del cultiu experimental (Bullock et al., 1997; Summerfelt et al, 1997). Cal destacar que en les tres repeticions es dona una disminució de l'oxigen dissolt en el mòdul de l'ozó, al mateix moment que els recomptes poblacionals també disminueixen. Això vol dir, que en molt poc temps la qualitat de l'aigua va empitjorar fent disminuir l'oxigen dissolt a causa del procés de putrefacció dels rotífers descomposats per l'efecte de l'ozó.

La salinitat és similar en els dos mòduls. L'aigua utilitzada per a cada repetició era aigua nova, de manera que la salinitat d'entrada no és un paràmetre que es pugui controlar. Per aquesta raó, la salinitat hauria de ser sempre semblant entre mòduls, però pot ser diferent amb el temps. Pel que fa a la temperatura es manté estable en cada una de les repeticions entre els 23 i 24°C.

Es va determinar la quantitat de nitrogen dissolt en l'aigua en forma d'amoni, nitrits i nitrats (Taula 17) en els dos mòduls per a veure'n la seva evolució, a l'inici i al final de l'experiment.

Taula 17: Resultats del nitrogen dissolt en l'aigua (mg/l).

Dia cultiu	Sense ozó				Amb ozó		
	Nivells ozó	Amoni (mg/l)	Nitrit (mg/l)	Nitrat (mg/l)	Amoni (mg/l)	Nitrit (mg/l)	Nitrat (mg/l)
3	0	0,01	0,005	2,4	0,00	0,021	2,5
6	6	0,00	0,009	2,3	0,00	0,002	2,7
3	0	0,00	0,007	2,4	0,00	0,025	3,6
6	6	0,00	0,005	2,1	0,00	0,004	3,0
3	0	0,00	0,002	1,6	0,03	0,017	1,5
6	6	0,00	0,007	0,9	0,00	0,003	1,2

Els bacteris nitrificants que transformen l'amoni en nitrit, i aquest en nitrat tenen una evolució semblant entre mòduls però a nivells diferents. L'animal experimental és clau per a veure'n l'evolució, ja que la producció de residus produïts per peixos és molt superior a la produïda per rotífers (el rotífer casi no produeix compostos nitrogenats). En tot l'experiment, l'amoni en cap dels dos mòduls no evoluciona, només ho fa de manera puntual.

Els nitrits són més elevats en el mòdul d'injecció d'ozó disminuint en un 85-90 % respecte l'inici de cada experiment (Suantika et al., 2001). Els nitrats també es redueixen en un 20 % però no tan bruscament com els nitrits, essent els nivells superiors en el mòdul d'injecció d'ozó. L'evolució d'aquests paràmetres es veu afectat per l'ozó (Suantika et al., 2003).

Altres paràmetres determinats en aquest experiment van ser: sòlids en suspensió (SST), terbolesa (FAU), clor i brom lliure (mg/l). En la taula 18 es mostren els resultats obtinguts dels dos mòduls.

Taula 18: Evolució dels paràmetres sòlids en suspensió (SST), terbolesa, clor i brom lliure en els dos mòduls de tractament d'aigües.

Dia cultiu	Sense ozó					Amb ozó			
	Nivells ozó	SST	Terbolesa	Cl lliure	Br lliure	SST	Terbolesa	Cl lliure	Br lliure
3	0	25	0	0,04	0,02	19	1	0,09	0,01
6	6	42	0	0,06	0,06	64	0	0,21	0,24
3	0	61	1	0,02	0,57	22	1	0,00	0,06
6	6	53	0	0	0,03	66	0	0,03	0,05

3	0	57	0	0,02	0,07	14	0	0,02	0,00
6	6	16	0	0,04	0,04	8	1	0,21	0,49

En cap d'aquests paràmetres no es veu una tendència clara. Com ja s'ha comentat anteriorment en l'apartat 4.1.2., es creu que el colorímetre Hach no era l'aparell adequat per a mesurar aquests paràmetres. S'ha de tenir en compte que les cistelles de malla no permetien una bona difusió dels sòlids en suspensió, ja que el micratge de la malla era molt petit (60 µm) i els sòlids en suspensió tenen un diàmetre superior.

Malgrat això, visualment sí que es veia algun efecte al color, la terbolesa i als sòlids en suspensió de l'aigua (Suantika et al., 2001).

Fent referència al potencial redox se'n van prendre mesures diàries (Taula 19). La taula mostra el nivell d'ozó aplicat i la lectura real a l'aigua de cultiu.

Taula 19: Evolució del potencial redox (mV) en els sistemes de cultiu.

Dia cultiu	Nivells ozó	Sense ozó	Amb ozó
1	0	12,7	11,1
5	6	-7,8	30,6
6	6	194,5	366,5
7	6	50,3	523,4
3	0	20,8	23,0
5	6	22,8	29,9
6	6	257,2	407,9
3	0	32,0	348,6
5	6	-8,1	-2,6
6	6	1,7	421,0
7	6	92,0	506,8

Els nivells evolucionen de manera irregular, possiblement degut a la sonda multiparamètrica utilitzada, ja que disposava d'un elèctrode de platí (veure apartat 4.1.2.). No té una tendència clara, però sí que gairebé sempre el mòdul d'injecció d'ozó està per sobre del mòdul control. S'ha de tenir en compte que el cultiu del rotífer ocupa poc espai dins el tanc de cultiu i les cistelles de malla ajuden a que l'aigua de cultiu del sistema es conservi més temps neta.

Els resultats referents a la **càrrega bacteriana** present en l'aigua de cultiu es mostren a la taula 20, en unitats formadores de colònies per ml (UFC/ml) en el mòdul control i en el mòdul d'injecció d'ozó, per a cada una de les repeticions. No es van trobar diferències significatives (U-Mann-Whitney, $N=9$, graus de llibertat=8, $T=89$, $P = 0,791$) entre ambdós tractaments, l'ús de l'ozó no va produir ninguna disminució en la càrrega bacteriana de l'aigua de cultiu del rotífer (Suantika et al., 2003). Possiblement la renovació d'aigua en les cistelles de malla no fos adequada ja que podia haver-hi masses turbulències, pel que s'haurien de buscar altres mètodes on mantenir el rotífer.

Taula 20: Evolució de la càrrega microbiana en els tancs de cultiu d'ambdós mòduls.

Dia cultiu	Nivells ozó	Sense ozó	Amb ozó
3	0	3,30E+02	1,06E+03
5	6	5,85E+03	1,60E+02*
6	6	1,39E+03	5,00E+01*
3	0	1,99E+03	7,45E+03
5	6	5,45E+03	1,92E+04
6	6	1,34E+04	6,29E+04*
3	0	2,69E+04	7,05E+03
5	6	5,45E+03	4,50E+03
6	6	9,00E+02	0,00E+00*

*Valor indicatiu

Tanmateix, la brusca mortalitat en els dos mòduls, en la repetició 2 a partir del dia 4 de cultiu, mostra un augment de les UFC/ml en l'aigua de cultiu, a causa del procés de putrefacció dels rotífers.

Es va dur un control del **recompte poblacional** de rotífers i rotífers ovats a diari presents en cada cistella de malla. Es realitzaven dos recomptes diaris del nombre de rotífers presents en 1 ml de cultiu, així com el nombre de femelles ovades i del nombre d'ous per femella. A fi de poder estimar bé quin era l'efecte de l'ozó sobre el cultiu, l'experiment es va repetir tres vegades. Cada una de les taules següents (Taula 21.1, 21.2 i 21.3) recull les dades d'aquests recomptes per a cada mòdul i, per separat, les tres repeticions que es van realitzar.

S'ha de tenir en compte que el primer recompte era el mateix per a totes les mostres de rotífer, ja que el rotífer provenia del mateix tanc de cultiu.

Taula 21.1: Evolució de la població de rotífers en la repetició 1.

SENSE OZÓ											
Dia cultiu	Nivells ozó	Nº rot/ml		Nº ous		Nº rot/ml		Nº ous		Total rotífer	% Femelles ovades
		(1r recompte)	1	2	(2n recompte)	1	2				
1	0 (malla 1)	500	-	-	-	-	-	4,00E+06	-		
1	0 (malla 2)	500	-	-	-	-	-	4,00E+06	-		
3	0 (malla 1)	1600	133	0	1736	134	1	1,33E+07	8,0		
3	0 (malla 2)	1296	209	3	1402	224	1	1,08E+07	16,2		
4	0 (malla 1)	1594	252	4	1306	257	0	1,16E+07	17,7		
4	0 (malla 2)	1196	122	0	1334	127	3	1,01E+07	10,0		
5	0 (malla 1)	1580	128	1	1526	127	1	1,24E+07	8,3		
5	0 (malla 2)	216	31	1	213	33	0	1,72E+06	15,2		
6	0 (malla 1)	1124	177	25	1132	171	22	9,02E+06	17,5		
6	0 (malla 2)	5	1	0	4	2	0	3,60E+04	33,3		
7	0 (malla 1)	761	185	6	765	172	8	6,10E+06	24,3		
7	0 (malla 2)	20	8	0	23	7	0	1,72E+05	34,9		
AMB OZÓ											
Dia cultiu	Nivells ozó	Nº rot/ml		Nº ous		Nº rot/ml		Nº ous		Total rotífer	% Femelles ovades
		(1r recompte)	1	2	(2n recompte)	1	2				
1	0 (malla 1)	500	-	-	-	-	-	4,00E+06	-		
1	0 (malla 2)	500	-	-	-	-	-	4,00E+06	-		
3	6 (malla 1)	1066	27	1	1192	28	0	9,03E+06	2,5		
3	6 (malla 2)	27	0	0	6	0	0	1,32E+05	0,0		
4	6 (malla 1)	1155	123	0	1192	118	0	9,39E+06	10,3		
4	6 (malla 2)	3	0	0	1	0	0	1,60E+04	0,0		
5	6 (malla 1)	1133	281	6	1121	285	8	9,02E+06	25,7		
5	6 (malla 2)	1	0	0	2	0	0	1,20E+04	0,0		
6	6 (malla 1)	1078	122	2	1064	125	1	8,57E+06	11,7		
6	6 (malla 2)	0	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,0		
7	6 (malla 1)	741	148	8	752	141	7	5,97E+06	20,4		
7	6 (malla 2)	0	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,0		

Taula 21.2: Evolució de la població de rotífers en la repetició 2.

SENSE OZÓ										
Dia cultiu	Nivells ozó	Nº rot/ml	Nº ous		Nº rot/ml	Nº ous		Total rotífer	% Femelles ovades	
		(1r recompte)	1	2	(2n recompte)	1	2			
1	0 (malla 1)	500	-	-	-	-	-	4,00E+06	-	
1	0 (malla 2)	500	-	-	-	-	-	4,00E+06	-	
1	0 (malla 3)	500	-	-	-	-	-	4,00E+06	-	
4	0 (malla 1)	121	2	0	143	4	0	1,06E+06	2,3	
4	0 (malla 2)	56	2	0	49	3	0	4,20E+05	4,8	
4	0 (malla 3)	75	0	0	62	1	0	5,48E+05	0,7	
5	0 (malla 1)	5	0	0	10	0	0	6,00E+04	0,0	
5	0 (malla 2)	17	0	0	20	0	0	1,48E+05	0,0	
5	0 (malla 3)	1	0	0	3	0	0	1,60E+04	0,0	
6	0 (malla 1)	5	0	0	4	0	0	3,60E+04	0,0	
6	0 (malla 2)	1	0	0	4	0	0	2,00E+04	0,0	
6	0 (malla 3)	1	0	0	0	0	0	4,00E+03	0,0	
AMB OZÓ										
Dia cultiu	Nivells ozó	Nº rot/ml	Nº ous		Nº rot/ml	Nº ous		Total rotífer	% Femelles ovades	
		(1r recompte)	1	2	(2n recompte)	1	2			
1	0 (malla 1)	500	-	-	-	-	-	4,00E+06	-	
1	0 (malla 2)	500	-	-	-	-	-	4,00E+06	-	
1	0 (malla 3)	500	-	-	-	-	-	4,00E+06	-	
4	6 (malla 1)	47	1	0	48	2	0	3,80E+05	3,2	
4	6 (malla 2)	443	2	0	453	2	0	3,58E+06	0,4	
4	6 (malla 3)	134	0	0	138	0	0	1,09E+06	0,0	
5	6 (malla 1)	85	0	0	79	0	0	6,56E+05	0,0	
5	6 (malla 2)	215	1	0	203	2	0	1,67E+06	0,7	
5	6 (malla 3)	28	0	0	31	0	0	2,36E+05	0,0	
6	6 (malla 1)	7	0	0	11	0	0	7,20E+04	0,0	
6	6 (malla 2)	149	0	0	147	0	0	1,18E+06	0,0	
6	6 (malla 3)	0	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,0	

Taula 21.3: Evolució de la població de rotífers en la repetició 3.

SENSE OZÓ									
Dia cultiu	Nivells ozó	Nº rot/ml		Nº ous		Nº rot/ml		Nº ous	
		(1r recompte)		1	2	(2n recompte)		1	2
1	0 (malla 1)	500	-	-	-	-	-	-	-
1	0 (malla 2)	500	-	-	-	-	-	-	-
1	0 (malla 3)	500	-	-	-	-	-	-	-
4	0 (malla 1)	996	13	0	1021	19	0	8,07E+06	1,6
4	0 (malla 2)	906	11	0	953	17	0	7,44E+06	1,5
4	0 (malla 3)	1079	6	0	1008	10	0	8,35E+06	0,8
5	0 (malla 1)	876	83	0	891	72	2	7,07E+06	8,9
5	0 (malla 2)	737	88	0	743	88	0	5,92E+06	11,9
5	0 (malla 3)	794	70	0	782	76	6	6,30E+06	9,6
6	0 (malla 1)	800	164	4	787	166	5	6,35E+06	21,4
6	0 (malla 2)	247	56	4	236	48	0	1,93E+06	22,4
6	0 (malla 3)	468	57	0	471	53	2	3,76E+06	11,9
7	0 (malla 1)	193	35	2	188	31	3	1,52E+06	18,6
7	0 (malla 2)	277	37	1	284	41	1	2,24E+06	14,3
7	0 (malla 3)	481	177	5	492	183	2	2,69E+06	54,5
8	0 (malla 1)	236	24	0	244	20	0	1,92E+06	9,2
8	0 (malla 2)	317	32	4	309	33	0	2,50E+06	11,0
8	0 (malla 3)	483	103	5	498	111	2	3,92E+06	22,5
AMB OZÓ									
Dia cultiu	Nivells ozó	Nº rot/ml		Nº ous		Nº rot/ml		Nº ous	
		(1r recompte)		1	2	(2n recompte)		1	2
1	0 (malla 1)	500	-	-	-	-	-	-	-
1	0 (malla 2)	500	-	-	-	-	-	-	-
1	0 (malla 3)	500	-	-	-	-	-	-	-
4	6 (malla 1)	971	11	0	994	21	2	7,86E+06	1,7
4	6 (malla 2)	227	0	0	246	2	0	1,89E+06	0,4
4	6 (malla 3)	909	21	0	1061	17	0	4,61E+07	0,3

5	6 (malla 1)	657	80	0	673	93	0	5,32E+06	13,0
5	6 (malla 2)	65	6	0	72	10	0	5,48E+05	11,7
5	6 (malla 3)	900	102	0	923	116	25	7,29E+06	13,3
6	6 (malla 1)	486	103	4	492	117	0	3,91E+06	22,9
6	6 (malla 2)	39	4	0	38	5	1	3,08E+05	13,0
6	6 (malla 3)	844	132	0	859	148	3	6,81E+06	16,6
7	6 (malla 1)	231	37	6	226	33	4	1,83E+06	17,5
7	6 (malla 2)	23	3	0	22	4	0	1,80E+05	15,6
7	6 (malla 3)	466	78	0	472	76	1	3,75E+06	16,5
8	6 (malla 1)	185	61	11	187	68	5	1,49E+06	39,0
8	6 (malla 2)	7	0	1	11	1	0	7,20E+04	11,1
8	6 (malla 3)	519	129	11	523	132	8	4,17E+06	26,9

En la repetició 1 i 3 s'observa que la població de rotífer es va mantenir més o menys estable tant en el tanc control com en el tanc d'aigua ozonitzada (en la repetició 1 una de les cistelles va patir una caiguda poblacional molt brusca a partir del cinquè i sisè dia de cultiu). Malgrat tot, en la repetició 2 i ambdós tancs (amb i sense ozó), la població inicial va patir una enorme disminució ja des del dia següent de la transferència a les condicions experimentals que no es va deure a l'experimentació sinó probablement a un mal estat inicial de la població utilitzada.

En qualsevol cas, no s'observa cap efecte de l'ozó sobre el creixement poblacional, els canvis que es van observar són iguals per als dos tractaments.

5.2. EXPERIMENT 5/DESINFECCIÓ DE ROTÍFER

El propòsit d'aquest assaig era estudiar l'efecte que provocava una alta dosi d'ozó sobre la vitalitat del rotífer (mortalitat, mobilitat, percentatge de femelles ovades) i sobre la càrrega bacteriana present en el rotífer un cop collit, en diferents temps d'exposició, 0,5, 1 i 2 minuts.

5.2.1. Material i mètodes

Cultiu experimental

L'espècie de rotífer utilitzada va ser el rotífer amb una població inicial de 1000 individus/ml. Tenint en compte que el volum era d'1 l, vol dir que es disposava de 1×10^6 rotífers en cada rèplica.

Disseny experimental i condicions de cultiu

El generador d'ozó utilitzat era l'Erwin Sander S1000 mg. El nivell d'ozó utilitzat per a realitzar la prova va ser el nivell màxim, a 1000 mg/h d'ozó injectat a l'aigua amb un difusor de fusta. El cabal d'aire d'entrada era de 10 l/h.

Es tractava d'utilitzar una població de rotífers collits del tanc de cultiu d'una malla i submergir-los durant 0,5, 1 i 2 minuts en aigua ozonitzada a 0,8 mg/l d'ozó. Per això, calia que prèviament s'omplís un cubell amb un volum de 10 l d'aigua de mar i s'injectés de manera contínua el màxim d'ozó que permetia el generador d'ozó durant 1h (Battaglione i Morehead, 2006).

Controls

Es va controlar el potencial redox del cubell d'aigua de mar amb el colorímetre Hach, en mg/l, pel mètode *Indigo Blue*.

Per al control microbiològic del rotífer, es realitzaven sèries en medi TSA i TCBS amb una incubació a 28°C per a veure el creixement de bacteris totals i vibrionacis abans i després del tractament, realitzant el recompte del nombre de colònies de les plaques a les 24 i 48h (Suantika et al., 2001; Suantika et al., 2003).

Els bacteris vibrionacis són bacteris oportunistes que estan en l'aigua, que en condicions no adequades són sempre patògens per a qualsevol larva de peix. Per aquesta raó, es volia valorar el nombre de colònies que podien ser patògens i provocar alguna malaltia en les larves de peix (Figura 26).

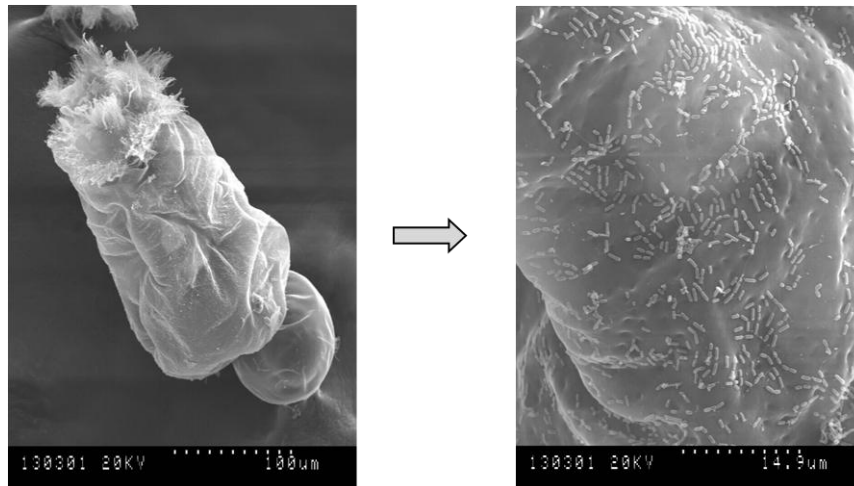


Figura 26: Rotífer d'un ou (esquerra); rotífer amb bacteris a la seva superfície (dreta).
Font: Giménez, 2005.

Les sembres es realitzaven de la manera següent: amb una població de 1×10^6 de rotífers en un volum de 1l d'aigua de mar filtrada i ultraviolada, es prenia una mostra de 50 ml que es filtrava en una malla de $60 \mu\text{m}$. El rotífer filtrat es ficava dins un tub d'assaig de 10 ml d'aigua de mar esterilitzada per als anàlisis posteriors. Es marcava com "0,5 minuts abans". El rotífer que quedava s'observava la mobilitat i es duia a terme un recompte de la població inicial de rotífer.

Aquesta població de rotífer inicial es submergia dins l'aigua ozonitzada ($0,8 \text{ mg/l}$ d'ozó) durant 0,5 minuts. Un cop transcorregut aquest temps d'exposició, s'agafava una mostra de 50 ml. El rotífer contingut en aquest volum es filtrava en una malla de $60 \mu\text{m}$ i es ficava dins un tub d'assaig de 10 ml d'aigua de mar esterilitzada per als anàlisis posteriors; es marcava com "0,5 minuts després". Amb la resta d'individus s'observava i s'anotava la supervivència de la població, la mobilitat i percentatge de femelles ovades.

El rotífer mantingut en els dos tubs d'assaigs es passava a un homogeneïtzador de vidre per a triturar-lo. Es prenia 1 ml de l'homogeneïtzat i es passava a un tub amb 9 ml d'aigua de mar esterilitzada per a diluir la mostra fins a 10^{-5} , tot seguit es realitzava la sembra. Es va procedir de la mateixa manera, en els diferents temps d'exposició d'ozó, 1 i 2 minuts.

Es va dur a terme un recompte del nombre de rotífers i rotífers ovats presents abans i després del tractament d'ozó amb una mostra representativa d'1 ml a la lupa, sense lugol, per a observar també la mobilitat d'aquests.

5.2.2. Resultats i discussió

No es van realitzar anàlisis dels paràmetres físico-químics de l'aigua ni tampoc de nitrogen dissolt, ja que l'experiment comptava amb un temps molt curt, de màxim 2 minuts.

Els resultats referents a la **càrrega bacteriana** present en el rotífer es mostren a la taula 22, en unitats formadores de colònies per ml (UFC/ml) amb diferents temps d'immersió en aigua ozonitzada.

Taula 22: Evolució de la càrrega microbiana (UFC/ml) de cultiu de rotífer amb diferents temps d'immersió en aigua ozonitzada.

		0,5 minuts		1 minut		2 minuts	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h
TSA	Abans immersió	1,88E+07	1,88E+07	3,19E+07*	3,19E+07*	7,90E+05	8,10E+05
	Després immersió	1,12E+07	1,12E+07	1,50E+07	1,50E+07	2,02E+05	2,07E+05
TCBS	Abans immersió	2,10E+05	2,10E+05	1,70E+05	1,70E+05*	2,82E+04	3,06E+04
	Després immersió	8,10E+04	8,11E+04	6,50E+05	6,50E+05	1,32E+04	1,57E+04

*Valor indicatiu

En aquest cas la immersió en aigua ozonitzada durant 0,5 minuts no va produir cap disminució en la càrrega bacteriana del rotífer ni en el nombre de colònies totals ni en els vibrionacis. Una exposició durant 1 minut no va afectar les colònies de bacteris totals presents ni als vibrionacis. Per últim, una immersió durant 2 minuts en aigua ozonitzada va provocar una reducció de les colònies totals a 1/3 de les presents inicialment en el rotífer i de la meitat dels vibrionacis, reducció que es va mantenir durant 48 hores (Suantika et al., 2001).

Per tant, es pot dir que realitzant una immersió en aigua ozonitzada durant 0,5 minuts la càrrega bacteriana associada al rotífer no es veu afectada per l'ozó, tampoc en l'exposició durant 1 min. En canvi, en 2 minuts d'immersió sí hi ha una reducció important, ja que disminueix en 1/3 les colònies totals i, a més a més, la meitat de les colònies de vibrionacis, això vol dir una baixada de la càrrega de bacteris associats al rotífer que puguin provocar malalties a les larves. Tenint en compte que el rotífer és el subministre d'aliment per les larves, aquest bany en aigua ozonitzada durant 2 minuts aniria molt bé per a evitar la transmissió de malalties bacterianes a les larves (Battaglene i Morehead, 2006).

Es va dur un control del **recompte poblacional** de rotífers i rotífers ovats presents en cada cistella de malla abans i després d'exposar-los a l'aigua ozonitzada. La taula següent (Taula 23) recull les dades d'aquests recomptes per a cada temps d'immersió de l'ozó que es va realitzar, amb una mostra inicial de 1000 individus/ml.

Taula 23: Evolució de la població de rotífers i rotífers ovats durant la desinfecció del cultiu amb diferents temps d'immersió en aigua ozonitzada.

	Nº rot/ml	Nº ous		Total rotífer	% Femelles ovades	Nº ous despresos		Observacions
		1	2			despresos	vius	
0,5 min. abans	1003	151	24	1,00E+06	17,4	0	0	-
0,5 min. després	1037	147	29	1,04E+06	17,0	11	567	molt pocs en descomposició
1 min. abans	981	134	32	9,81E+05	16,9	0	0	-
1 min. després	926	184	62	9,26E+05	20,6	20	334	pocs en descomposició
2 min. abans	990	258	49	9,90E+05	31,0	0	0	-
2 min. després	653	112	2	6,53E+05	17,5	14	24	molts en descomposició

En aquest cas, la immersió durant 0,5 i 1 minut en aigua ozonitzada no va provocar cap disminució en la població total de rotífers o en el percentatge de femelles ovades. Malgrat tot, una immersió de 2 minuts va reduir 1/3 la població de rotífers i 1/2 el percentatge de femelles ovades. Tenint en compte que el percentatge de femelles ovades és el millor indicador de l'estat de la població, no interessa tenir una disminució tan important d'aquest paràmetre.

En resum, seria interessant trobar un temps d'immersió intermig, entre 1 i 2 minuts, que no afectés al percentatge de femelles ovades, mantenint la població de rotífer el màxim possible i provocar una reducció en la càrrega microbiana.

5.3. Experiment 6/Cultiu i desinfecció de rotífer

Aquest experiment va ser una combinació dels dos assajos anteriors, valorant el potencial redox més adequat per a que el rotífer no es veiés afectat i, alhora, en disminuís la càrrega bacteriana del cultiu (tant de l'aigua com del cultiu).

L'objectiu era valorar l'efecte de diferents nivells d'ozó en l'aigua sobre el creixement de la població de rotífer (mortalitat, mobilitat, percentatge de femelles ovades), sobre la flora bacteriana present en l'aigua de cultiu i en el rotífer, amb un potencial redox de 450 i 750 mV durant 24 hores, a fi de veure si l'efecte de l'ozó sobre els bacteris lliures en l'aigua de cultiu era el mateix, que sobre els que estan associats al rotífer, bé en la superfície del cos del rotífer o en el sistema digestiu.

5.3.1. Material i mètodes

Cultiu experimental

L'espècie de rotífer utilitzada va ser el rotífer amb una població inicial de 500 individus/ml, això vol dir 4×10^6 rotífers per cistella de malla.

Les cistelles de malla emprades eren iguals a les utilitzades en l'experiment 4, de 50 μm , d'una capacitat volumètrica de 8 litres. Es van utilitzar cinc malles flotants, dos en el mòdul control i tres en el mòdul d'injecció d'ozó.

Disseny experimental i condicions de cultiu

El generador d'ozó utilitzat va ser OZONFILT® OZVa de tipus 1 i 2 ProMaqua.

L'experiment es va realitzar amb dos potencials redox diferents, 450 i 750 mV durant 24h cada un, mostrejant a les 15 i a les 23h. Es mostrejava el rotífer i l'aigua de cultiu del rotífer. Es realitzava també un recompte del nombre de rotífers i percentatge de femelles ovades a fi de veure com evolucionava la població.

L'alimentació va ser amb llevat en pols de panificadora (subministrat per Mauri), subministrat d'acord amb les instruccions del fabricant, en comptes d'utilitzar un producte comercial.

En el mòdul control i en el d'injecció d'ozó el cabal era de 32 l/h i la temperatura era de 24°C. Es tenia un registre de dades en continu dels nivells d'oxigen dissolt en l'aigua, la temperatura i el cabal en els dos mòduls.

Controls

Es van controlar els paràmetres físico-químics de l'aigua (pH, oxigen, salinitat i temperatura) amb la sonda YSI per a què els dos mòduls estiguessin en les mateixes condicions. El potencial redox es controlava amb les sondes d'elèctrodes d'or connectades al generador d'ozó.

Per al control microbiològic del rotífer, es realitzaven sembres en medi TSA i TCBS amb una incubació a 28°C i veure el creixement de bacteris totals i vibris, abans i després del tractament, fent 24 hores més tard el recompte del nombre de colònies de les plaques (Suantika et al., 2001; Suantika et al., 2003).

Les sembres d'aigua i rotífer s'analitzaven de la següent manera: amb una població de 4×10^6 de rotífers en una malla de 8l de capacitat, es prenia una mostra de 50 ml que es filtrava en una malla de 60 µm. El rotífer filtrat es ficava dins un tub d'assaig de 10 ml d'aigua de mar esterilitzada per als anàlisis posteriors, igual com l'aigua de cultiu filtrada. Amb la resta d'individus s'observava la mobilitat i es realitzava un recompte de la població de rotífer i rotífers ovats.

El rotífer mantingut en els tubs d'assaigs es passava a un homogeneïtzador de vidre per a triturar-lo. Es prenia 1 ml de l'homogeneïtzat i es passava a un tub amb 9 ml d'aigua de mar esterilitzada per a diluir la mostra fins a 10^{-5} , tot seguit es realitzava la sembra. Es va procedir de la mateixa manera, amb l'aigua de cultiu del rotífer.

El fet de sembrar aigua i rotífer era per a veure si l'efecte de l'ozó sobre els bacteris era el mateix sobre els que estan lliures en l'aigua de cultiu que sobre els bacteris que estan associats al rotífer, bé en la superfície del cos del rotífer o en el sistema digestiu.

En cada mostreig es duia a terme un recompte del nombre de rotífers i rotífers ovats presents en cada cistella de malla amb una mostra representativa d'1 ml a la lupa amb una gota de lugol, aquest tenyeix els organismes de color morat fent més fàcil el recompte poblacional (Suantika et al., 2001; Suantika et al., 2003). Aquesta tasca es repetia per a cada mostreig a fi d'avaluar l'evolució de la població i, així, subministrar l'aliment adequat per a cada malla. La mobilitat era l'observació d'una mostra representativa d'1 ml sense lugol, cada vegada que es realitzava el recompte, homogeneïtzant prèviament la mostra.

5.3.2. Resultats i discussió

Es va dur un seguiment dels **paràmetres físico-químics** de l'aigua (Taula 24). La taula mostra el nivell d'ozó aplicat (en potencial redox, mV) en l'aigua de cultiu.

Taula 24: Paràmetres físico-químics de l'aigua de cultiu de rotífer.

	pH	O ₂ (mg/l)	Sal (‰)	T (°C)
Sense ozó	8,36	8,31	35,1	23,2
Amb ozó, 450 mV	8,42	8,32	35,1	23,8
Sense ozó	8,35	7,59	35,1	24,0
Amb ozó, 750 mV	8,39	8,31	35,2	24,3

Tots els paràmetres es van mantenir estables. Cada prova, una amb 450 mV i l'altra amb 750 mV, va durar 24h, molt poc temps per què l'ozó afectés als paràmetres físico-químics de l'aigua.

Es va dur un control del **recompte poblacional** de rotífers i rotífers ovats presents en cada malla i per a cada mostreig. La taula següent (Taula 25) recull les dades d'aquests recomptes, amb una mostra inicial de 500 individus/ml. S'ha de tenir en compte que el primer recompte era el mateix per a totes les mostres de rotífer, ja que el rotífer provenia del mateix tanc de cultiu.

Taula 25: Evolució de la població de rotífers en potencials redox diferents.

	Inici	Recompte a les 15h		Recompte a les 23h				
	Nº rot/ml	Nº rot/ml	Nº ous		Nº rot/ml	Nº ous		
			1	2		1	2	
	Sense ozó (malla 1)	500	952	94	2	1343	60	0
	Sense ozó (malla 2)	-	627	84	2	1144	30	0
	Amb ozó (malla 1), 450 mV	-	884	77	0	900	38	0
	Amb ozó (malla 2), 450 mV	-	764	46	1	1166	38	0
	Amb ozó (malla 3), 450 mV	-	795	64	2	396	14	0
	Sense ozó (malla 1)	500	1035	152	4	740	42	0
	Sense ozó (malla 2)	-	1590	98	2	262	14	0
	Amb ozó (malla 1), 750 mV	-	520*	0	0	0	0	0
Amb ozó (malla 2), 750 mV	-	512*	0	0	0	0	0	
Amb ozó (malla 3), 750 mV	-	446*	0	0	0	0	0	

*Rotífers morts i desintegrats

A la prova de 450 mV el creixement de les poblacions en les diferents cistelles de malles en el mòdul control augmenta, i en el mòdul tractat amb ozó es manté o augmenta amb el temps. El percentatge de rotífers ovats, en tots dos mòduls, disminueix amb el temps.

En canvi, el tractament amb 750 mV d'ozó va provocar la mortalitat total de la població al cap de poques hores, per aquesta raó es va escollir el tractament de 450 mV com el més adequat i segur per al cultiu del rotífer. Aquests resultats van ser decisius per a plantejar el següent experiment.

Els resultats referents a la **càrrega bacteriana** present en l'aigua de cultiu del rotífer i la present en el rotífer es mostren a la taula 26 en unitats formadores de colònies per ml (UFC/ml) en els diferents potencials redox en l'aigua de cultiu.

Taula 26: Evolució de la càrrega microbiana (UFC/ml) de l'aigua de cultiu del rotífer (part esquerra) i de la càrrega associada al rotífer (part dreta).

450 mV		Sense ozó	Amb ozó	Sense ozó		Amb ozó		
		Aigua	Aigua	Malla 1	Malla 2	Malla 1	Malla 2	Malla 3
TSA	Mostreig 15h	0,00E+00	2,50E+02*	2,58E+05	2,50E+02	6,65E+05	6,20E+05	8,85E+05
	Mostreig 23h	5,00E+01*	6,50E+02*	1,56E+05	1,27E+05	2,38E+05	2,92E+06	6,10E+05
TCBS	Mostreig 15h	0,00E+00	0,00E+00	7,40E+04	4,65E+04	4,35E+05	2,70E+04*	2,01E+04
	Mostreig 23h	5,00E+01*	0,00E+00	7,75E+03	2,25E+03*	1,30E+04	1,56E+05	3,80E+04

750 mV		Sense ozó	Amb ozó	Sense ozó		Amb ozó		
		Aigua	Aigua	Malla 1	Malla 2	Malla 1	Malla 2	Malla 3
TSA	Mostreig 15h	2,50E+02*	0,00E+00	2,10E+06	2,90E+05	2,67E+06	3,00E+06*	5,90E+05
	Mostreig 23h	9,50E+02*	0,00E+00	3,00E+06*	3,00E+06*	-	-	-
TCBS	Mostreig 15h	0,00E+00	0,00E+00	2,31E+05	1,55E+05	6,60E+05	1,09E+06	1,39E+05
	Mostreig 23h	2,50E+02*	0,00E+00	1,92E+06	7,40E+04	-	-	-

*Valor indicatiu

Amb un potencial redox de 450 mV les mostres d'aigua no mostren cap tendència en bacteris totals ni en vibriónacs. Els bacteris associats als rotífers tampoc presenten diferències significatives (en TSA: U-Mann-Whitney, N=2, graus de llibertat=1, T=3, P=0,333; en TCBS: U-Mann-Whitney, N=2, graus de llibertat=1, T=3, P=0,333).

Amb un potencial de 750 mV no es van realitzar les sèries corresponents, ja que el rotífer no va aguantar un potencial redox tan elevat; l'ozó va acabar lisant les cèl·lules dels rotífers.

5.4. Experiment 7/Cultiu i desinfecció de rotífer

Com s'ha dit anteriorment, aquest experiment es va plantejar gràcies als resultats de l'experiment anterior.

L'objectiu era valorar l'efecte d'un determinat nivell d'ozó (450 mV) en l'aigua sobre el cultiu de rotífer (mortalitat, mobilitat, percentatge de femelles ovades), sobre la flora bacteriana present en l'aigua de cultiu i en el rotífer durant 3 dies. Així, comprovar que aquest nivell d'ozó no era tòxic pel cultiu del rotífer, ja que 24h no és suficient temps per a veure'n algun efecte (com mostra l'experiment anterior).

5.4.1. Material i mètodes

Cultiu experimental

Es va utilitzar la mateixa espècie de rotífer amb una població inicial de 500 individus/ml, 4×10^6 rotífers per cistella. Les cistelles de cultiu de rotífer eren de 50 μ m, d'una capacitat volumètrica de 8 litres. Es van utilitzar cinc cistelles flotants, dos del mòdul control i tres del mòdul d'injecció d'ozó.

Disseny experimental i condicions de cultiu

El generador d'ozó utilitzat era OZONFILT® OZVa de tipus 1 i 2 ProMaqua.

L'experiment es va realitzar amb un potencial redox de 450 mV durant 3 dies, mostrejant a les 0 i a les 24 hores. Es van alimentar amb llevat en pols de panificadora (de la casa Mauri), subministrat d'acord amb les instruccions del fabricant.

En cada mostreig es realitzava també un recompte de nombre de rotífers i percentatge de femelles ovades presents en cada cistella de malla a fi de veure l'evolució de la població (veure apartat 5.3.1.).

En el mòdul control i en el d'injecció d'ozó el cabal era de 32 l/h i la temperatura era de 24°C. Es tenia un registre de dades en continu dels nivells d'oxigen dissolt en l'aigua, la temperatura i el cabal en els dos mòduls.

La sembra d'aigua i rotífer es realitzava de la mateixa manera que l'experiment anterior (veure apartat 5.3.1.).

Controls

Es van controlar els paràmetres físico-químics de l'aigua (pH, oxigen, salinitat i temperatura) a diari amb la sonda YSI per a què els dos mòduls estiguessin en les mateixes condicions. El potencial redox es controlava amb les sondes d'elèctrodes d'or connectades al generador d'ozó. A l'inici de l'experiment es van mesurar els següents paràmetres amb el colorímetre Hach: amonis, nitrits i nitrats, a fi de tenir els mateixos nivells de nitrogen dissolt en l'aigua en els dos mòduls.

Els mostrejos es realitzaven a les 0 i les 24h, tan les sembres com el recompte de rotífers i rotífers ovats.

Pel control microbiològic de l'aigua de cultiu, es van realitzar sembres en medi TSA i TCBS, incubant a 28°C i fent 24 hores més tard el recompte del nombre de colònies de les plaques per a cada potencial redox (Suantika et al., 2001; Suantika et al., 2003).

5.4.2. Resultats i discussió

Es va dur un seguiment dels **paràmetres físico-químics** de l'aigua, com també la quantitat de nitrogen dissolt en l'aigua en forma d'amonis, nitrits i nitrats (mg/l) (Taula 27) en aigua ozonitzada a 450 mV per a comprovar la igualtat de condicions.

Taula 27: Paràmetres físico-químics de l'aigua del cultiu de rotífer i nivells de nitrogen dissolt en l'aigua (mg/l) a ambdós mòduls.

	pH	O ₂ (mg/l)	Sal (‰)	T (°C)	Amonis	Nitrits	Nitrats
Sense ozó	8,36	8,31	35,1	23,2	0,03	0,005	0,5
Amb ozó, 450 mV	8,42	8,32	35,1	23,8	0,04	0,005	1,8

Tots els paràmetres es van mantenir estables i els nivells de nitrogen dissolt eren gairebé els mateixos a l'inici de l'experiment, exceptuant els nitrats. Aquest és l'últim element que es forma dins d'un SRA per el biofiltre i que no és tòxica per als organismes aquàtics, de manera que no influeix la diferència que hi ha entre mòduls.

Els resultats referents a la **càrrega bacteriana** present en el rotífer i l'aigua de cultiu del rotífer es mostren a la taula 28, en unitats formadores de colònies per ml (UFC/ml). S'ha de tenir en compte que la sembra el Dia 1, era la mateixa per a totes les mostres de rotífer, ja que el rotífer provenia del mateix tanc de cultiu.

Taula 28: Evolució de la càrrega microbiana (UFC/ml) de l'aigua de cultiu del rotífer (part esquerra) i de la càrrega associada al rotífer (part dreta), on:

Dia 1= Dia 1, 0h
 Dia 2= Dia 1, 24h i Dia 2, 0h
 Dia 3= Dia 2, 24h i Dia 3, 0h
 Dia 4= Dia 3, 24h

		Sense ozó	Amb ozó	Sense ozó		Amb ozó		
TSA		Aigua	Aigua	Malla 1	Malla 2	Malla 1	Malla 2	Malla 3
	Dia 1	-	-	3,64E+04	-	-	-	-
	Dia 2	1,14E+03	4,38E+03	1,72E+04	4,46E+03	6,80E+03	5,06E+04	6,60E+03
	Dia 3	5,30E+02	7,80E+02	1,20E+02*	2,20E+02*	4,34E+02	5,60E+02	8,02E+03
	Dia 4	1,98E+02	1,27E+02	2,10E+02	2,25E+03	1,59E+03	4,00E+02	3,50E+01
TCBS	Dia 1	-	-	1,82E+02	-	-	-	-
	Dia 2	1,98E+02	3,74E+02	9,00E+02	2,78E+02	5,34E+03	2,90E+04	2,48E+02
	Dia 3	9,20E+01	1,00E+02	6,40E+01	1,32E+02	2,36E+02	1,42E+02	2,20E+03*
	Dia 4	8,00E+00*	1,00E+00*	5,00E+00*	1,76E+02	1,84E+02	5,00E+00*	2,00E+00*

*Valor indicatiu

La càrrega bacteriana en l'aigua de cultiu té tendència descendent en els dos mòduls (bacteris totals i vibrionacis), sense mostrar diferències (en TSA: t de Student, N=3, graus de llibertat=2, $t=-0,844$, $P = 0,446$; en TCBS: t de Student, N=3, graus de llibertat=2, $t=-0,474$, $P = 0,660$). La càrrega bacteriana associada al rotífer no presenta diferències significatives en bacteris totals (t de Student, N=4, graus de llibertat=3, $t=-0,269$, $P = 0,797$) ni en vibrionacis (t de Student, N=4, graus de llibertat=3, $t=-0,991$, $P = 0,360$).

Es va dur un control del **recompte poblacional** de rotífers i rotífers ovats presents en cada cistella de malla en cada mostreig. La taula següent (Taula 29) recull les dades d'aquests recomptes, amb una mostra inicial de 500 individus/ml.

Taula 29: Evolució de la població de rotífers a 450 mV.

	Dia 1			Dia 2			Dia 3			Dia 4		
	Ind/ml	1 ou	>1 ou	Ind/ml	1 ou	>1 ou	Ind/ml	1 ou	>1 ou	Ind/ml	1 ou	>1 ou
Sense ozó (malla 1)	474	37	-	304	6	0	105	8	0	35	0	0
Sense ozó (malla 2)	-	-	-	314	14	0	141	7	0	79	0	0
Amb ozó (malla 1)	-	-	-	468	26	0	168	8	0	40	0	0
Amb ozó (malla 2)	-	-	-	166	17	0	148	2	0	70	2	0
Amb ozó (malla 3)	-	-	-	466	6	0	146	2	0	33	0	0

S'ha de tenir present que el primer recompte era el mateix per a totes les mostres de rotífer, ja que el rotífer provenia del mateix tanc de cultiu.

En tots els casos, tant en les cistelles de malla control com en les tractades amb ozó es va observar una disminució de la població el dia 3 en un 65% i del percentatge de femelles ovades al llarg de 3 dies de cultiu. Això pot ser degut a un mal estat de la població inicial de rotífer.

Contrastant aquest experiment amb el 4, es pot dir que 450 mV seria un potencial redox adequat pel rotífer, però amb la necessitat de repetir-lo ja que el 4 dona uns resultats de creixement poblacional molt superiors en un període de temps més llarg.

5.5. Discussió general

Els paràmetres físico-químics no s'han estudiat en detall degut al curt temps d'experimentació, sí que s'han controlat i han tingut una evolució estable.

S'ha vist que amb un potencial redox de 750 mV es mor la totalitat de la població de rotífer en poques hores (menys de 15h), pel que s'ha de treballar a un potencial menor. A 450 mV no se sap ben bé com evoluciona la població degut als diferents resultats obtinguts.

A l'experiment 4 hi ha un augment de la població del rotífer de més del doble respecte la inicial en un període de temps d'una setmana (nombre de rotífer i nombre de femelles ovades), fet que demostra que aquest cultiu creix en bones condicions. L'experiment 6, a un potencial redox de 450 mV, mostra un creixement ascendent del nombre de rotífers, respecte el nombre de femelles ovades disminueix amb el temps. Pel que fa l'últim experiment de rotífer (experiment 7), la població descendeix amb el temps, molt probablement pel mal estat inicial de la població utilitzada. Analitzant aquests resultats, es creu que s'hauria de realitzar un altre experiment, de manera que quedés clar quin és el resultat de mantenir el rotífer durant un determinat temps en aigua ozonitzada a 450 mV.

Pel que fa la desinfecció dels bacteris associats al rotífer, dóna resultats molt interessants. Per una banda, amb un temps d'immersió d'1 minut en aigua ozonitzada amb 0,8 mg/l d'ozó, es redueix la càrrega de bacteris totals però sense afectar als vibrionacis ni al percentatge de femelles ovades (indicador de l'estat poblacional del cultiu del rotífer). D'altra banda, 2 minuts d'immersió en aigua ozonitzada dóna molts bons efectes en la càrrega bacteriana, sobre tot per què elimina 1/3 part dels bacteris vibrionacis disminuint el risc de transmissió de malalties bacterianes a les larves (Battaglione i Morehead, 2006). El gran inconvenient és que afecta al percentatge de femelles ovades reduint-lo a la meitat. Seria interessant tornar a realitzar la prova en un temps d'entre 1 i 2 minuts, per a trobar els beneficis dels dos.

La desinfecció de l'aigua de cultiu del rotífer no és clara, ja que els resultats de les anàlisis estadístiques no donen diferències significatives.

Per tant, es pot dir que s'assoleix una desinfecció del rotífer però no de l'aigua de cultiu. També s'obté un valor llindar superior de potencial redox en el que no es pot cultivar el rotífer.

6. CAPÍTOL III: EXPERIMENTACIÓ AMB EL BIOFILTRE

Aquest experiment pretenia estudiar l'efecte de l'ozó sobre la reducció dels compostos nitrogenats presents en un sistema de recirculació d'aigua, amb la finalitat d'estimar el percentatge de reducció d'aquests compostos nitrogenats i estimar la possible reducció de la mida del filtre biològic (que té aquesta mateixa acció de disminuir els components nitrogenats).

Encara que en el cas de l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita els sistemes de recirculació v.1.2. són de petit tamany i estan adaptats a mantenir una càrrega de peixos molt petita (màxim de 36-40 kg), en altres instal·lacions de major càrrega la mida del biofiltre (volum i ocupació de les instal·lacions) és de vital importància. D'aquesta manera, si l'ozó pot col·laborar a reduir en part el contingut de components nitrogenats en l'aigua, ajudarà a dimensionar filtres biològics de menor tamany.

6.1. Experiment 8/Biofiltre

L'objectiu d'aquest experiment era veure si el subministrament d'ozó contribuïa a la reducció dels components nitrogenats en l'aigua formats a partir de l'addició d'amoníac en una dosi prefixada.

6.1.1. Material i mètodes

Cultiu experimental

En aquest experiment no intervenia de cap organisme aquàtic, ja que farien variar els valors de nitrogen dissolts en l'aigua. Es va veure, que afegint 2 ml d'amoníac en 10 litres d'aigua salada, s'aconseguia 1 ppm d'amoni; així doncs, es va prosseguir amb la quantitat valorada en totes les proves amb diferents potencials redox (1,5 m³ del tanc de cultiu i 0,5 m³ del mòdul, per tant, 400 ml d'amoníac). Es treballava en igualtat de condicions als dos mòduls, afegint-hi la mateixa quantitat d'amoníac al mòdul control i al mòdul d'injecció d'ozó.

Disseny experimental

El generador d'ozó utilitzat va ser OZONFILT® OZVa de tipus 1 i 2 ProMaqua.

Es va treballar amb diferents nivells d'ozó: 200, 400, 600 i 800 mV, i en circuit tancat. L'experiència durava 24h per a cada potencial redox, mostrejant a les 0, 1, 6 i 24h per a veure l'evolució dels paràmetres de

l'aigua. Els dos mòduls treballaven amb tots els seus elements, fins i tot el biofiltre.

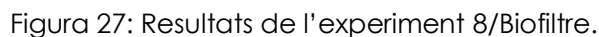
En el mòdul control i en el d'injecció d'ozó el cabal era de 32 l/h, amb un sol tanc de cultiu de 1,5 m³. Per als dos mòduls es tenia un registre de dades durant l'experiment, per a l'oxigen dissolt en l'aigua, la temperatura i el cabal.

Controls

Es van controlar els paràmetres físico-químics de l'aigua (pH, salinitat, temperatura i oxigen) amb la sonda YSI 556 MPS. Es van mesurar els següents paràmetres amb el colorímetre Hach en els quatre mostrejos: amonís, nitrits, nitrats i brom lliure; aquests últim es valorava només al primer i últim mostreig.

6.1.2. Resultats i discussió

Es va dur un seguiment dels **paràmetres físico-químics** de l'aigua, com també la quantitat de nitrogen dissolt en l'aigua en forma d'amonís, nitrits i nitrats (mg/l), però també de brom lliure en l'aigua (Taula 30). Els resultats indiquen que l'ozó, sí contribueix a la reducció dels components nitrogenats, com indiquen les figures mostrades a continuació (Figura 26).



81

Taula 30: Evolució dels paràmetres físico-químics de l'aigua, nitrogen dissolt i brom lliure (mg/l), en el mòdul control i en el d'injecció d'ozó.

SENSE OZÓ									AMB OZÓ						
		pH	Sal (‰)	T (°C)	Amoni (mg/l)	Nitrit (mg/l)	Nitrat (mg/l)	Br lliure (mg/l)	pH	Sal (‰)	T (°C)	Amoni (mg/l)	Nitrit (mg/l)	Nitrat (mg/l)	Br lliure (mg/l)
200 mV	Mostreig 0h	8,29	34,0	13,4	0,00	0,027	0,90	0,00	8,34	34,0	13,4	0,00	0,017	2,70	0,23
	Mostreig 1h	8,49	34,1	15,4	0,90	0,016	1,80	-	8,51	34,1	15,3	0,48	0,014	1,30	-
	Mostreig 6h	8,41	34,0	17,8	2,40	0,008	0,23	-	8,44	34,0	17,5	2,10	0,009	0,30	-
	Mostreig 24h	8,36	34,2	20,4	1,60	0,030	1,80	0,05	8,32	34,2	20,2	1,60	0,048	1,80	0,23
400 mV	Mostreig 0h	8,14	34,4	17,0	0,00	0,014	0,70	0,00	8,15	34,3	17,1	0,00	0,024	0,10	0,09
	Mostreig 1h	8,38	34,5	17,2	0,57	0,010	0,60	-	8,44	34,3	17,1	2,30	0,020	0,60	-
	Mostreig 6h	8,33	34,4	18,8	2,00	0,071	0,80	-	8,31	34,3	18,8	1,80	0,038	0,50	-
	Mostreig 24h	8,17	34,4	21,2	1,50	0,371	0,30	0,02	8,20	34,3	21,3	0,38	0,070	1,70	0,04
600 mV	Mostreig 0h	8,25	33,7	15,9	0,23	0,006	0,30	0,00	8,26	33,6	14,7	0,02	0,006	0,60	0,05
	Mostreig 1h	8,45	33,7	15,8	2,00	0,007	0,10	-	8,44	33,8	16,5	2,00	0,007	0,60	-
	Mostreig 6h	8,30	33,7	16,9	1,80	0,017	0,20	-	8,31	33,8	18,0	1,90	0,008	1,30	-
	Mostreig 24h	8,20	33,9	20,6	1,30	0,093	0,60	0,00	8,21	33,9	21,4	1,50	0,025	1,10	0,80
800 mV	Mostreig 0h	8,19	34,7	20,8	0,13	0,064	0,70	0,01	8,21	34,7	21,1	0,00	0,005	0,70	1,93
	Mostreig 1h	8,29	34,7	21,1	0,52	0,078	0,60	-	8,26	34,7	21,3	0,33	0,008	0,90	-
	Mostreig 6h	8,21	34,8	21,7	0,59	0,182	0,40	-	8,12	34,7	21,7	0,06	0,004	0,60	-
	Mostreig 24h	8,18	34,8	22,1	0,13	0,345	0,80	0,04	8,23	34,8	22,1	0,00	0,008	0,40	4,01

6.2. Discussió general

Els paràmetres físico-químics tenen una evolució estable, exceptuant la temperatura, ja que en iniciar-se l'experiment els dos mòduls s'omplien amb aigua nova, i durant les 24 h d'experimentació l'aigua del mòdul s'atempitava a la temperatura de la sala (20°C).

Aquest experiment mostra que el subministrament d'ozó sí contribueix en la reducció de compostos nitrogenats dissolts en l'aigua de diferent manera en funció del potencial redox utilitzat en l'aigua de mar.

El potencial redox fa que la concentració d'ozó actui de diferent manera amb els compostos nitrogenats. Amb un potencial de 400 mV s'obtenen uns resultats similars als de 600 mV reduint unes 8 vegades el nivell de nitrits, però amb la diferència d'haver un augment molt important de ions brom en el mòdul d'injecció d'ozó amb 600 mV de potencial redox.

Tenint en compte que els nivells de ions brom són tòxics per als organismes aquàtics, de la mateixa manera que els elevats nivells de nitrits també ho són, el nivell adequat per a sistemes d'aqüicultura marina seria un potencial redox de 400 mV.

7. CONCLUSIONS

Els resultats dels tres estudis, en alguns casos, no han estat molt significatius per la qual cosa s'ha hagut de fer estudi de tendències. Tot seguit, es detallen les conclusions per cadascun dels casos estudiats.

En quant a les proves realitzades amb peixos:

- 1) L'ozó provoca una més ràpida transformació de l'amoni i amoníac en nitrits i posteriorment nitrats.
- 2) L'ozó no altera, al menys de manera significativa, els paràmetres físico-químics (pH, oxigen, salinitat i temperatura) de l'aigua marina.
- 3) Els sòlids en suspensió, terbolesa, clor i brom lliure, no han donat resultats prou clarificadors per dictar cap conclusió en base a un estudi de tendències, tot i que s'ha de dir que sí han mostrat, a nivell visual, un efecte degut a l'aplicació d'ozó.
- 4) Tot i que no s'observa una desinfecció de bacteris totals de l'aigua de cultiu, s'ha vist una tendència descendent, si es comparen els tancs del mòdul control vers els d'injecció d'ozó, de fins a dos ordres de magnitud en algun cas.
- 5) L'ozó en elevades dosis influeix de manera negativa sobre els peixos, generant canvis de comportament i en la natació, portant en molts casos a la mort dels individus afectats.

En quant a les proves realitzades amb rotífer (*Brachionus plicatilis*):

- 6) A un potencial redox de 750 mV es produeix la mortalitat total de la població en menys de 15 hores.

En quant a la prova realitzada amb el biofiltre:

- 7) D'entre totes les opcions provades per tal d'establir un potencial redox òptim per reduir els compostos nitrogenats, s'aprecia que el nivell és de 400mV. A més a més, gairebé no es generen productes residuals de l'ozó.

Com a conclusió final, es proposa seguir treballant en aquest àmbit ja que s'apunten resultats força interessants. D'una banda, s'ha vist la millora sobre la qualitat microbiològica de l'aigua i del rotífer i, d'altra banda, la reducció dels compostos nitrogenats que experimenta l'aigua de cultiu gràcies a la injecció d'ozó en el mòdul experimental, entre d'altres beneficis ja esmentats.

La valoració d'aquests resultats encoratgen a pensar que hi ha un futur prometedor en l'ús de l'ozó com a mètode de desinfecció en els sistemes de recirculació utilitzats en aqüicultura marina.

8. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

Aguayo, E., Escalona, V.H. y Artés, F. 2005. Revisión: El ozono y su utilización en la industria agroalimentaria. Alimentaria, Revista de Tecnología e Higiene de los Alimentos, N° 366, pàg. 34-47.

Aiken, A., 2004. Use of foam fractionator for improving water quality in marine aquaria. 1st. Aquality Symposium, 2-7 Abril. Oceanario de Lisboa, Portugal.

Aquaculture Engineering Society, USA. Disponible a: www.aesweb.org

AquaNIC-Aquaculture Network Information Center, USA. Disponible a: www.aquanic.org

Aveiga, M. V., Costa, A. M., 2009. Tesi "Determinación de la cinética de inactivación de *Escherichia coli* con ozono". Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil, Ecuador.

Battaglione, S. C., Morehead, D. T., 2006. Tolerance of striped trumpeter *Latris lineata* embryos to ozonated seawater. Aquaculture 14, pàg. 421-429.

Ben-Atia, I., Lutzky, S., Barr, Y., Gamsiz, K., Shutpler, Y., Tandler, A., Koven, W., 2007. Improved performance of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, larvae after ozone disinfection of the eggs. Aquaculture Research 38, pàg. 166-173.

Blogoslawski, W. J., Thurberg, F. P., Dawson, M. A., 1973. Ozone inactivation of a *Gymnodinium breve* toxin. Water Research 7, pàg. 1701-1703.

Botes, L., Smith, A. J., Cook, P. A., 2003. The potential threat of algal blooms to the abalone (*Haliotis midae*) mariculture industry situated around the South African coast. Harmful algae 2, pàg. 247-259.

Buchan, K. A. H., Martin-Robichaud, D. J., Benfey, T. J., 2005. Measurement of dissolved ozone in seawater: a comparison of methods. Aquacultural engineering 33, N° 3, pàg. 225-231.

Bullock, G. L., Summerfelt, S. T., Noble, A. C., Weber, A. L., Durant, M. D., Hankins, J. A., 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system. I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria. Aquaculture 158, pàg. 43-55.

- Castelló, F., 1993. "Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción". Editorial: Universitat de Barcelona. Espanya.
- Chang, C-N., Ma, Y-S., Zing, F-F., 2002. Reducing the formation of disinfection by-products by pre-ozonation. *Chemosphere* 46, pàg., 21-30.
- Chen, J-C., Lin, C-Y., 1995. Responses of oxygen consumption, ammonia-N excretion and urea-N excretion of *Penaeus chinensis* exposed to ambient ammonia at different salinity and pH levels. *Aquaculture* 136, pàg. 243-255.
- Coman, G. J., Sellars, M. J., Morehead, D. T., 2005. Toxicity of ozone generated from different combinations of ozone concentration (C) and exposure time (T) : a comparison of the relative effect of C and T on hatch rate of *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* embryos. *Aquaculture* 244, pàg. 141-145.
- Coman, G. J., Sellars, M. J., 2007. Tolerance of *Penaeus monodon* Fabricius embryos to ozonated seawater. *Aquaculture Research* 38, pàg. 420-428.
- Curs avançat a l'IRTA de Sant Carles de la Ràpita: "Sistemas de recirculación y su aplicación en acuicultura", Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Espanya, 10-14 Març, 2008.
- Dempsey, B., 2004. Application of ozone for disinfection of aquarium life support systems. 1st. Aquality Symposium, 2-7 Abril. Oceanario de Lisboa, Portugal.
- Díaz, R., Gamazo, C., López-Goñi, I., 1999. "Manual Práctico de Microbiología". Cap. 16: Técnica de recuento de bacterias. 2a Ed. Masson S. A. Barcelona, España, pàg. 55.
- Estévez, A., 2000. Manual del S.I.G. IRTA, Procediments de treball. Intruccions tècniques: Cultivo del rotífero *Brachionus* sp.
- Fernández-Crehuet, M., Moreno, O., Pérez, J. A., 2001. Determinación de cloro residual. Método del DPD. *Higiene y Sanidad ambiental* 1, pàg. 6-7.
- Fernández-Tejedor, M., Soubrier-Pedreño, M. A., Furones, D., 2004. Acute LD50 of a *Gyrodinium corsicum* natural population for *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Harmful Algae* 3, pàg. 1-9.
- Food and Agriculture Organization. Disponible at: www.fao.org

Garcés, E., Fernández, M., Penna, A., Van Lenning, K., Gutiérrez, A., Camp, J., Zapata, M., 2006. Characterization of nw mediterranean *Karlodinium* sp (dinophyceae) strains using morphological, chemical, and physiological methodologies. *Journal of Phycology*, Volum 42, N° 5, October, pàg. 1096-1112.

Generalitat de Catalunya, Espanya. Disponible a: www20.gencat.cat/

Giménez, G., 2005. Desinfección de presas vivas con Ox-Aquaculture ©. C.A.-IRTA (Sant Carles de la Ràpita), 21 d'abril de 2005. Disponible a http://www.recercat.net/bitstream/2072/10663/1/SCR_210405.pdf

Giménez, G., Padrós, F., Roque, A., Estévez, A., Furones, D., 2006. Bacterial load reduction of live prey for fish larval feeding using Ox-Aquaculture©. *Aquaculture Research* 37, pàg. 1130-1139.

Gomà i Huguet, A., 2001. Implantación de ozonización 100% en las piscinas de la Universidad Autónoma de Barcelona. Universitat Autònoma de Barcelona.

Grguric, G., Trefry, J. H., Keaffaber, J. J., 1994. Ozonation products of bromine and chlorine in seawater aquaria. *Water Research* 28, N° 5, pàg. 1087-1094.

Hach Company DR/870 Colorimeter, Procedures Manual. USA: Hach Company, 1999.

Henry, A. A., González, C. R., 2008. Influence of the temperature of the water in the distribution of immature stage of *Simuliidae* (diptera, insecta) in Lluta River, Arica, Chile. *IDESIA* 26, N°3, pàg. 45-49, Desembre.

Instrucciones de servicio, Manejo, Dulcomarin ® II. Alemanya: ProMinent, 2000.

Instructions for use Ozoniser Model S1000. Alemanya: Erwin Sander, Aquarientechnik, 2007.

Johnson, J. V., Hotz, A., Lord, J., 2009. Pilot testing for inactivation of non-indigenous seawater organisms by ozonation and ultraviolet sterilization. 15th Annual Aquatic Animal Life Support Operators Symposium, Seattle, April 2009.

Juan, E., 2004. Tesi "Lixiviación de metales con ozono acuoso. Cinética de la plata y el oro. Aplicaciones". Universitat de Barcelona, España.

Karnik, B. S., Davies, S. H., Baumann, M. J., Masten., S. J., 2005. The effects of combined ozonation and filtration on disinfection by-product formation. *Water Research* 39, pàg. 2839-2850.

Khadre, M. A., Yousef, A. E., Kim, J. G., 2001. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science*, 2001, 66(9), pàg. 1242-52.

Kureshy, N., Davis, D. A., Arnold, C. R., 1999. Effect of ozone treatment on cultures of *Nannochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, and *Chaetoceros gracilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol 30, N° 4, pàg. 473-480.

Lawson, T. B., Merry, G., 1991. Ozone use in recirculating systems: comparisons with other disinfections options. *Proceedings of a Workshop on of High Density Recirculating Aquaculture Systems*, R.M. Malone, ed., National Sea Grant College Program and Louisiana State University, Baton Rouge, LA, pàg. 80-88, 25-27 September.

Liltved, H., Vogelsang, C., Modahl, I., Dannevig, G. H., 2006. High resistance of fish pathogenic viruses to UV irradiation and ozonated seawater. *Aquacultural Engineering*, N° 34, pàg. 72-82.

Ling, S. W., 1977. *Aquaculture in Southeast Asia: a historical overview*. Washington Sea Grant Publication (University of Washington Press), pàg. 94-96.

Ling, J., Chen, S., 2005. Impact of organic carbon on nitrification performance of different biofilters. *Aquacultural engineering* 33, pàg. 150-162.

Losordo, T. M., Masser, M. P., Rokocy, J., 1998. Recirculating aquaculture tank production systems. An overview of critical considerations. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC), Publication n° 451.

Losordo, T. M., 2004. *Aquaculture Production in tank-based recirculating systems*. Department of Biological & Agricultural Engineering. North Carolina State University.

Melin, E. S., Odegaard, H., 2000. The effect of biofilter loading rate on the removal of organic ozonation by-products. *Water Research* 34, N° 18, pàg. 4464-76.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, SAGPYA. República Argentina. 2006. Disponible at: www.produccion-animal.com.ar/

Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Pesca, Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), Espanya. Disponible a: www.mapa.es

Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Espanya. Disponible a: www.mtas.es/

Operating Instructions Manual, Ozonfilt® OZVa, Type 1 and 2. Alemanya: ProMinent, 2000.

Otte, G., Rosenthal, H., 1979. Management of a closed brackish water system for high density fish culture by biological and chemical treatment. *Aquaculture*, N° 18, pàg. 169-181.

Ozone-Generators for laboratory & Industry. Alemanya: Erwin Sander, 2001.

Pallarès, D., Durán, J. M., 2006. Aplicación de ozono en disoluciones nutritivas recirculantes. Universidad Politécnica de Madrid, Departamento de Producción Vegetal: Fitotecnia, Escuela técnica superior de ingenieros agrónomos, Madrid.

Pegasal, S. L. Espanya. Disponible at: www.pegasal.es/

Phillip, R., Kingsley, E., Mansergh, S., Weber, R., 2004. Foam fractionation versus ozone contacting: impacts on water quality in a natural seawater system. 1st International Symposium of water quality and treatment in Zoos and aquaria. Lisbon Oceanarium.

Planes Nacionales de Cultivos Marinos, Junta nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR). Tecnología de recirculación y desinfección en acuicultura marina. 2005.

ProMinent, Ozonfilt OZVa, Modelo 1 y 2. Manual de instrucciones de funcionamiento. ProMinent Dosierttechnik GMBH, 2004.

ProMinent Iberia, S. A., Espanya. Disponible a: www.prominent.es

Ritar, A. J., Smith, G. G., Thomas, C. W., 2006. Ozonation of seawater improves the survival of larval southern rock lobster, *Jasus edwardsii*, in culture from egg to juvenile. *Aquaculture* 261, pàg. 1014-1025.

Rosenthal, H., 1980. Ozonation and sterilization. European Inland Fisheries Advisory Council (EIFAC) Symposium on New Developments in the utilization of heated effluents and of recirculation systems for intensive culture, Stavanger, Norway.

Seguridad laboral y Salud Ocupacional, Alemania. Disponible a: www.arbeitssicherheit.de

Sengco, M. R., 2009. Prevention and control of *Karenia brevis* blooms. Harmful algae 8, pàg. 623-628.

Sharrer, M. J., Summerfelt, S. T., 2007. Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculating system. Aquacultural Engineering 37, pàg. 180-191.

Sistemas y equipos de ozonización, Espanya. Disponible a: www.oxicom.es

Smith, G. G., Battaglione, S. C., Ritar, A. J., 2006. Use of ozone in the larval culture of spiny lobster and striped trumpeter in Tasmania. Proceedings of 6th International Conference on Recirculating Aquaculture, Virginia, July 20-23, pàg. 224-253.

Suantika, G., Dhert, P., Nurhudah, M., Sorgeloos, P., 2000. High density production of the rotifer *Brachionus plicatilis* in a recirculation system: consideration of water quality, zootechnical and nutritional aspects. Aquacultural engineering 21, pàg. 201-214.

Suantika, G., Dhert, P., Rombaut, G., Vandenberghe, J., De Wolf, T., Sorgeloos, P., 2001. The use of ozone in a high density recirculation system of rotifers. Aquaculture 201, pàg. 35-49.

Suantika, G., Dhert, P., Sweetman, E., O'Brien, E., Sorgeloos, P., 2003. Technical and economical feasibility of a rotifer recirculation system. Aquaculture 227, pàg. 173-189.

Suh, K-H., Kang, L-S., Lee, M-G., Lee, B-H., 1997. Application of a foam fractionator in a recirculating aquaculture system in M B. Timmons and T. Losordo (Eds). Aquaculture Engineering Society Proceedings III. Advances in Aquacultural Engineering. Proceedings from the Aquacultural Engineering Society (AES) Technical Sessions at the Fourth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Cornado Springs Resorts. Walt Disney World. Orlando, Florida. November 9-12, pàg. 59-65.

Summerfelt, S. T., Hochheimer, J. M., 1997. Review of ozone Processes and applications as an oxidizing agent in aquaculture. The progressive Fish-Culturist 59, pàg. 94-105.

Summerfelt, S. T., Hankins, J. A., Weber, A. L., Durant, M D., 1997. Ozonation of a recirculating rainbow trout culture system. II: Effects on microscreen filtration and water quality. Aquaculture 158, pàg. 57-67.

Summerfelt, S. T., 2003. Ozonation and UV irradiation—an introduction and examples of current applications. *Aquacultural engineering* 28, pàg. 21-36.

Summerfelt, S. T., Sharrer, M. J., Tsukuda, S. M., Gearheart, M., 2009. Process requirements for achieving full-flow disinfection of recirculating water using ozonation and UV irradiation. *Aquacultural Engineering* 40, pàg. 17-27.

Tango, M. S., Gagnon, G. A., 2003. Impact of ozonation on water quality in marine recirculation systems. *Aquacultural Engineering* 29, pàg. 125-137.

Timmons, M. B., Chen, S., Weeks, N. C., 1991. An application model of foam fractionators used in aquaculture. *Proceedings of a Workshop on of High Density Recirculating Aquaculture Systems*, R.M. Malone, ed., National Sea Grant College Program and Louisiana State University, Baton Rouge, LA, pàg. 68-79, 25-27 September.

Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., Summerfelt, S. T., Vinci, B. J., 2002. "Recirculating aquaculture systems". *Northeastern Regional Aquaculture Center, NRAC Publication N° 01-002*, Ithaca, NY, USA.

Timmons, M. B., Losordo, T. M., 1994. "Aquaculture water reuse systems: Engineering design and management". Elsevier Editors, Amsterdam, Holanda.

Tucker, J.W., 1998. *Marine Fish Culture*. Kluwer Academic Publishers, Boston, pàg. 750.

Tyrovola, K., Diamadopoulos, E., 2005. Bromate formation during ozonation of groundwater in coastal areas in Greece. *Desalination* 176, pàg. 201-209.

Villalta, M., 2007. Requerimientos en ácidos grasos esenciales y organogénesis de la larva del lenguado senegalés *Solea senegalensis*. Tesis doctoral, Universitat autònoma de Barcelona, Facultat de veterinària, Departament de biologia animal, de biologia vegetal i d'ecologia, Barcelona.

Water treatment solutions, Espanya. Disponible a: www.lenntech.es

Wheaton, F., 1977. *Recirculating Aquaculture systems: an overview of waste management*. Aquacultural Engineering, second printing. Robert E. Krieger Publishing Company. Malabar, Florida.

Wurts, W. A., Durborow, R. M., 1992. Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC), Publication N° 464.

Yang, M., Uesugi, K., Myoga, H., 1999. Ammonia removal in bubble column by ozonation in the presence of bromide. *Water Research* 33, N° 8, pàg. 1911-1917.

Zhang, X., Echigo, S., Lei, H., Smith, M. E., Minear, R. A., Talley, J. W., 2005. Effects of temperature and chemical addition on the formation of bromoorganic DBPs during ozonation. *Water Research* 39, pàg. 423-435.

Zohar, Y., Tal, Y., Schreier, H., Steven, C., Stubblefield, J., Place, A., 2005. Commercially feasible urban recirculating aquaculture: addressing the marine sector. *Urban Aquaculture*, Cambridge, USA: CABI Publishing. Pàg. 159-171.

1st International Symposium of water quality and treatment in Zoos and Aquaria. Disponible a: www.aqualitysymposium.org